



Università degli Studi di Firenze

Dottorato di Ricerca in Biosistemica ed Ecologia Vegetale
SCUOLA DI DOTTORATO "UBALDO MONTELATICI"
XXIV ciclo – *BIO/03 Botanica ambientale e applicata*



Risposte morfologiche, fisiologiche e geniche all'ozono della specie arbustiva *Viburnum lantana* L.

Tesi di dottorato di Elena Gottardini

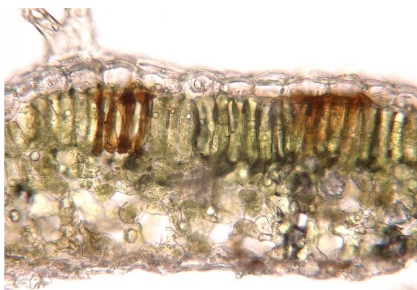


Coordinatore del dottorato

Prof. Paolo Grossoni

Tutor

Dott. Filippo Bussotti



Co-tutor

Dott.ssa Cristina Nali
Università di Pisa

Dott. Nicola La Porta
Fondazione Edmund Mach

Dott. Marco Ferretti
TerraData environmetrics



Gennaio 2012

Università degli Studi di Firenze

Dottorato di Ricerca in Biosistemica ed Ecologia Vegetale
SCUOLA DI DOTTORATO “UBALDO MONTELATICI”
XXIV ciclo – *BIO/03 Botanica ambientale e applicata*

Risposte morfologiche, fisiologiche e geniche all’ozono della specie arbustiva *Viburnum lantana* L.

Tesi di dottorato di Elena Gottardini

Coordinatore del dottorato

Prof. Paolo Grossoni

Tutor

Dott. Filippo Bussotti

Co-tutor

Dott.ssa Cristina Nali
Università di Pisa

Dott. Nicola La Porta
Fondazione Edmund Mach

Dott. Marco Ferretti
TerraData environmetrics

Gennaio 2012

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi sono stati d'aiuto e che mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo:

- la Fondazione Edmund Mach, nella persona del direttore del Centro Ricerca e Innovazione dott. Roberto Viola, per avermi dato la possibilità di svolgere questa ricerca nell'ambito dell'attività lavorativa;
- il dott. Filippo Bussotti dell'Università di Firenze, per gli insegnamenti e l'aiuto, soprattutto nel campo della fluorescenza della clorofilla, e per la supervisione generale del lavoro;
- la dott.ssa Cristina Nali dell'Università di Pisa, per l'ospitalità, il sostegno e la collaborazione nella realizzazione della sperimentazione svolta presso i laboratori del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "Giovanni Scaramuzzi" dell'Università di Pisa;
- il dott. Nicola La Porta della Fondazione Edmund Mach, per avermi incoraggiata ed aiutata ad intraprendere gli approcci della biologia molecolare;
- il dott. Marco Ferretti di TerraData environmetrics, per il contributo nell'impostazione del lavoro, nella definizione dei disegni sperimentali e i consigli nell'elaborazione dei dati e nella revisione del testo;
- la dott.ssa Elisa Pellegrini dell'Università di Pisa, per la collaborazione e l'aiuto nella realizzazione delle prove sperimentali e delle analisi svolte presso l'Università di Pisa;
- il dott. Giovanni Bacaro di TerraData environmetrics, per le mappe di rischio ozono;
- il dott. Francesco Geri di TerraData environmetrics, per la selezione delle aree di studio in campo del 2010;
- il dott. Paolo Baldi della Fondazione Edmund Mach, per la disponibilità, i consigli e l'aiuto nella realizzazione delle analisi di biologia molecolare;
- il dott. Fabio Zottele della Fondazione Edmund Mach, per l'aiuto nelle questioni GIS;
- il dott. Mauro Confalonieri e il personale del Servizio Foreste e Fauna per i dati sull'ozono;
- il vivaio forestale "Casteller", per aver fornito le piante di viburno utilizzate nello studio in ambiente controllato;

- il dott. Gabriele Tonidandel dell'Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente di Trento per i dati sull'ozono;
- il dott. Filippo Prosser del Museo Civico di Rovereto, per la cartografia floristica del viburno;
- il dott. Davide Bettini, per l'entusiasmo e l'aiuto nella perlustrazione del Trentino in cerca di viburni ;
- la dott.ssa Lisa Veronesi, per la collaborazione nei rilievi in campo dell'estate 2010.

Un ringraziamento speciale desidero farlo alle colleghe e amiche Fabiana Cristofolini, Antonella Cristofori e Maria Cristina Viola per tutto l'aiuto che mi hanno dato, la disponibilità, la professionalità e molto altro: con loro ho condiviso tanta parte del lavoro ed ho la fortuna di continuare a farlo.

Infine, ma avrei dovuto metterlo all'inizio, un ulteriore grazie a Marco Ferretti, per la scintilla che ha provocato tutto questo.

*Ad Agata e Amelia,
le mie stelle polari*

“Un esperimento che non ottenga i risultati previsti non è un fiasco. Lo è solo quando non fornisce alcuna conclusione valida, in un senso o nell’altro, rispetto alle ipotesi di partenza.”

Robert M. Pirsig

Lo Zen e l’arte della manutenzione della motocicletta

INDICE

Riassunto	1
Abstract	3
1. PREMESSA	5
1.1 L'ozono troposferico	6
1.2 Meccanismi di fitotossicità dell'ozono ed effetti sulla vegetazione	10
1.3 Valutazione del rischio ozono per la vegetazione	12
1.4 Livelli di ozono in Trentino: il contesto in cui si colloca lo studio	13
1.5 Il biomonitoraggio dell'ozono	16
1.6 La specie ozono-sensibile <i>Viburnum lantana</i> L.: rispondenza ai requisiti di un bioindicatore	19
1.7 Obiettivo della ricerca e struttura del progetto	25
2. PRIMO STUDIO OSSERVAZIONALE IN CAMPO: ANDAMENTO TEMPORALE DEI SINTOMI FOGLIARI E DELLA RISPOSTA FOTOSINTETICA	27
2.1 Introduzione	27
2.2 Materiali e Metodi	28
2.2.1 Disegno sperimentale	28
2.2.2 Misura dei parametri ambientali nel periodo di studio	30
2.2.2.1 Concentrazioni di ozono e stime di esposizione	31
2.2.2.2 Dati meteorologici	31
2.2.3 Rilievo degli indicatori di risposta	31
2.2.3.1 Sintomi fogliari	31

2.2.3.2 Contenuto di clorofilla (SPAD)	32
2.2.3.3 Fluorescenza diretta della clorofilla a	32
2.2.4 Analisi dei dati	37
2.3 Risultati	37
2.3.1 Parametri ambientali nel periodo di studio	37
2.3.2 Sintomi fogliari	40
2.3.3 Contenuto di clorofilla e fluorescenza diretta della clorofilla a	42
2.3.3.1 Aspetti metodologici	42
2.3.3.2 Andamento temporale del contenuto di clorofilla e della fluorescenza diretta della clorofilla a	45
2.3.4 Relazioni tra parametri ambientali e risposte morfo- fisiologiche delle piante	49
2.4 Discussione	53
3. SECONDO STUDIO OSSERVAZIONALE IN CAMPO: ANDAMENTO SPAZIALE DEI SINTOMI FOGLIARI	57
3.1 Introduzione	57
3.2 Materiali e Metodi	58
3.2.1 Disegno sperimentale	58
3.2.1.1 Fasi preliminari per l'individuazione delle celle uni-chilometriche	58
3.2.1.2 Procedure per l'individuazione delle piante	60
3.2.2 Rilievi e numerosità	61
3.2.3 Analisi dei dati	62
3.3 Risultati	62
3.4 Discussione	69
4. SPERIMENTAZIONE IN AMBIENTE CONTROLLATO	71
4.1 Introduzione	71
4.2 Materiali e Metodi	74

4.2.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita	74
4.2.2 Descrizione delle condizioni di fumigazione	74
4.2.3 Disegno sperimentale, numerosità campionarie, campionamento	75
4.2.4 Metodologie analitiche	77
4.2.4.1 Sintomi fogliari	77
4.2.4.2 Contenuto di clorofilla (SPAD)	77
4.2.4.3 Fluorescenza diretta della clorofilla a	77
4.2.4.4 Fluorescenza modulata della clorofilla a	77
4.2.4.5 Analisi dei pigmenti fotosintetici	79
4.2.4.6 Analisi dei carboidrati	80
4.2.4.7 Ibridazione sottrattiva soppressiva (PCR-select)	81
4.2.5 Analisi dei dati	87
4.3 Risultati	88
4.3.1 Sintomi fogliari	88
4.3.2 Contenuto di clorofilla e fluorescenza diretta della clorofilla a	89
4.3.3 Fluorescenza modulata della clorofilla a	97
4.3.4 Contenuto fogliare di pigmenti fotosintetici	98
4.3.5 Contenuto fogliare di carboidrati	101
4.3.6 PCR-select	102
4.4 Discussione	106
5. CONCLUSIONI GENERALI	109
6. BIBLIOGRAFIA	113

Riassunto

L'ozono troposferico è ritenuto uno degli inquinanti potenzialmente più dannosi per la vegetazione a causa del suo alto potere ossidante. Le eccedenze rispetto ai valori standard definiti dall'Unione Europea per la protezione della vegetazione sono piuttosto elevate e diffuse, cosicché ampie parti della superficie coltivata e delle foreste europee risultano esposte a livelli di ozono potenzialmente dannosi.

L'impatto dell'ozono sulle piante è il risultato di molteplici fattori quali la sua concentrazione in atmosfera, l'assorbimento stomatico, che a sua volta dipende da condizioni ambientali e fisiologiche, le capacità di detossificazione dell'individuo. La complessità di tali fattori e le loro interazioni possono rendere difficile stabilire una chiara relazione tra ozono e risposta dell'organismo, in condizioni reali di campo. L'uso di specie vegetali come bioindicatori può rappresentare una soluzione poiché essi riflettono e sintetizzano i processi metabolici che avvengono in conseguenza dell'esposizione all'inquinante.

Scopo della tesi è esplorare le potenzialità di utilizzo della specie arbustiva *Viburnum lantana* come bioindicatore *in situ* per valutare i potenziali effetti dell'ozono sulla vegetazione spontanea. I motivi di questa scelta risiedono nella sua nota e documentata sensibilità nei confronti dell'ozono, nella specificità di risposta (sintomi fogliari consistenti in punteggiature internerviali adassiali, da rosso-scuro a bruno-nere), nell'ampia distribuzione territoriale. Tuttavia non è completamente noto se tale specie soddisfi tutti i requisiti per essere utilizzata come bioindicatore *in situ*. In particolare occorre verificare l'effettiva capacità di risposta delle piante spontanee di *V. lantana* all'ozono in condizioni di campo e la relazione tra l'intensità di tali risposte ed i livelli di esposizione all'ozono. A tale scopo sono stati svolti due studi in campo, uno a scala locale (1) e uno su larga scala (2), sul territorio della provincia di Trento; inoltre ne è stato svolto uno studio in ambiente controllato (3), allo scopo di approfondire le conoscenze relativamente agli effetti dell'ozono a livello biochimico, fisiologico e genico su *V. lantana*.

(1) Il primo studio, realizzato nel 2009, mirava a verificare l'andamento temporale delle risposte delle piante all'ozono durante il periodo vegetativo. A tal fine sono state considerate due aree 1x1 km, distanti tra loro ca. 3 km, caratterizzate da diversi livelli di inquinante. L'adozione di un disegno sperimentale completamente randomizzato ha garantito la presenza di repliche in ciascuna area e la selezione delle piante spontanee di *V. lantana*. Sulle queste è stato monitorato lo sviluppo dei sintomi fogliari ozono-specifici, il contenuto di clorofilla (SPAD) e la fluorescenza diretta della clorofilla *a* durante tutta una stagione vegetativa.

(2) Il secondo studio, realizzato nel 2010, mirava a comprendere se *V. lantana* risponde in maniera quantitativa in relazione a livelli differenziati di esposizione all'ozono. A tal fine è stato adottato un disegno stratificato (quota x ozono) completamente randomizzato per la selezione di 30 celle 1 x 1 km sulle quali valutare la risposta della specie. Su tutte le celle

unichilometriche, classificate per i diversi livelli di esposizione all'ozono e di quota, sono dunque stati effettuati i rilievi della frequenza di piante sintomatiche. Questo secondo studio in campo ha avuto come dominio spaziale l'intera superficie della provincia di Trento (6200 km²).

(3) Per lo studio in ambiente controllato, 9 piante coltivate di *V. lantana* sono state sottoposte a fumigazione con concentrazioni note di ozono (60 ppb per 45 giorni consecutivi, 5 ore al giorno) (trattato); altrettante piante sono state mantenute alle medesime condizioni ambientali ad esclusione del contaminante (controllo). Le analisi hanno riguardato presenza e sviluppo temporale dei sintomi fogliari, contenuto di clorofilla (SPAD), fluorescenza della clorofilla *a*, livelli fogliari di pigmenti fotosintetici e carboidrati (HPLC) ed espressione genica.

Complessivamente, i risultati in campo hanno consentito di verificare uno sviluppo temporale delle risposte di *V. lantana* coerente con l'andamento dei livelli di esposizione all'ozono. È stata riscontrata una maggior probabilità di trovare elevate percentuali di piante sintomatiche dove le concentrazioni di ozono sono maggiori, anche se la frequenza dei sintomi non è sempre risultata proporzionata al livello di esposizione all'ozono. In concomitanza con la comparsa e la diffusione dei sintomi fogliari, si è rilevata la diminuzione del contenuto di clorofilla nelle foglie e un calo della performance fotosintetica. Nell'analisi del *transient* di fluorescenza della clorofilla *a*, un segnale precoce di risposta all'ozono è dato dal parametro ΔV_{LP} che indica la capacità dell'accettore finale di elettroni d'essere ridotto. A parità di livello di esposizione all'ozono, le piante sintomatiche sono risultate sempre più frequenti alle quote più elevate (sopra i 700 m s.l.m.), facendo supporre che esse siano sottoposte a condizioni ambientali più favorevoli all'assorbimento stomatico di ozono (maggiore umidità relativa e temperatura meno elevata) nonché ad un possibile maggior stress ossidativo (dovuto ad esempio alla radiazione solare).

Le analisi ecofisiologiche e metaboliche svolte nello studio in ambiente controllato hanno permesso di confermare la ridotta capacità fotosintetica e il minore contenuto di clorofilla, nonché un sistema non completamente efficace di protezione dalla fotoinibizione, delle piante trattate con ozono. Ciò sembra costituire la base della sensibilità di tale specie nei confronti dell'inquinante.

La specie arbustiva *V. lantana* L. - della quale è stata verificata la sensibilità nei confronti dell'ozono e la specificità di risposta anche in condizioni reali campo - risulta dunque adatta come bioindicatore *in situ* per valutare in maniera qualitativa l'impatto potenziale di questo inquinante in aree remote. I sintomi fogliari su questa specie si confermano quindi validi indicatori di risposta all'ozono anche se la loro interpretazione in termini di potenziale danno alla vegetazione necessita sempre di grande cautela.

Abstract

Because its oxidative power, tropospheric ozone is considered, at the large scale, the most harmful pollutant to vegetation. The exceedances of critical levels set to protect vegetation are quite high and widespread, so that large parts of crops and forests in Europe are exposed to potentially harmful levels of ozone.

The impact of ozone on vegetation is the result of multiple factors such as the concentration in the atmosphere, the stomatal uptake - which depends on environmental and physiological factors -, and the detoxification potential of plants. The complexity of these factors and their interactions can make it difficult to establish a clear relationship between ozone and plant response under field conditions. The use of plants as bioindicators may be a solution because they reflect and summarize all processes that occur between ozone exposure and the response of the plant.

The aim of this research is to explore the potential of the shrub species *Viburnum lantana* L. as a bioindicator *in situ* to assess the potential effects of ozone on native vegetation. This species is known to be sensitive to ozone, has a specific response (visible foliar injuries, consisting in red stipples on the upper leaf surface), and a wide spatial distribution. However it is not fully known if *V. lantana* meets all the requirements to be used as a bioindicator. In particular, the actual responsiveness to ozone of native plants and the relationship between the intensity of responses and the levels of exposure to the pollutant under field conditions remain to be evaluated. For these purposes, two field studies were carried out in the Province of Trento (North Italy) at local (1) and large scale (2). Moreover, a study under controlled conditions (3) was carried out in order to deepen the knowledge about the effects of ozone on *V. lantana* at biochemical, physiological and genetic level.

(1) The first study was carried out in 2009 and aimed at assessing the time course of plant responses to ozone during the growing season. To this, two 1x1 km quadrates were considered. The two quadrates, located 3 km apart, were characterized by different levels of ozone. The adoption of a completely randomized experimental design ensured replication in each area and the selection of plants. Plants were monitored for the development of ozone-specific foliar symptoms, the chlorophyll content (SPAD) and the fluorescence of chlorophyll *a* during the entire growing season.

(2) The second study was carried out in 2010 and aimed at verifying the response of *V. lantana* to different levels of ozone exposure. To this end, a stratified random sampling design (elevation x ozone) was adopted to select 30 1x1 km quadrates. On all quadrates, the assessment of symptomatic plants was carried out. For this second field study, the spatial domain was the entire surface of the province of Trento (6.200 km²).

(3) For the study in controlled environment, 9 potted plants of *V. lantana* were subjected to fumigation with known concentrations of ozone (60 ppb for 45 days, 5 hours per day)

(treated), while other 9 plants were maintained under the same environmental conditions with the exception of ozone (control). Plants were analyzed for the presence and development of foliar symptoms, chlorophyll content (SPAD), fluorescence of chlorophyll *a*, leaf content of photosynthetic pigments and carbohydrate (HPLC) and gene expression.

Overall, the results of the two field studies allowed to verify (1) a temporal development of the responses of *V. lantana* consistent with the trend of ozone exposure; and (2) an higher frequency of symptomatic plants where ozone levels were also higher. However, the frequency of symptoms was not always proportionate to the level of ozone exposure. At the same time of the onset and spread of foliar symptoms, a decrease in the foliar chlorophyll content and in photosynthetic performance occurred. The analysis of the fluorescence transient of chlorophyll *a* showed an early response to ozone for the parameter ΔV_{I-P} , that indicates the ability of the final electron acceptor to be reduced. Interestingly, when comparing similar ranges of ozone exposures, symptomatic plants were always more frequent at higher altitudes (above 700 m a.s.l.): this may suggests that they are subjected to an additional oxidative stress (e.g. due to solar radiation), and/or that environmental conditions are more favourable to ozone uptake (high relative humidity and relative lower temperature).

The physiological and metabolic analysis carried out on plants treated with ozone, confirmed their reduced photosynthetic capacity and their lower content of chlorophyll, as well as a not completely effective system to protect plants against photo-inhibition. This behavior is probably the cause of the sensitivity of this species in relation to the ozone.

V. lantana - whose sensitivity and specificity of response to ozone were verified also in real field conditions - seems suitable as a bioindicator *in situ* to qualitatively assess the potential impact of ozone, for large-scale surveys and in remote areas. Foliar symptoms on this species are also confirmed as valid response indicators of ozone, although their interpretation in terms of potential damage to vegetation always requires great caution.

1.

PREMESSA

L'argomento affrontato nell'ambito di questa tesi riguarda gli effetti sulla vegetazione dell'ozono troposferico (O_3), che attualmente è ritenuto uno dei più pericolosi inquinanti gassosi in Europa (EEA, 2009). Elevati livelli di ozono possono causare problemi alla salute umana (WHO, 2008) ed aumento di mortalità (Stafoggia *et al.*, 2010), danni alla vegetazione (UN/ECE, 2004; Ashmore, 2005; Wittig *et al.*, 2009), alterazioni quali - quantitative delle produzioni agrarie (Mills *et al.*, 2007; Booker *et al.*, 2009), variazioni nella composizione delle specie vegetali (Pfleeger *et al.*, 2010; Payne *et al.*, 2011), danni ad infrastrutture e beni culturali (Screpanti & De Marco, 2009; Varotsos *et al.*, 2009).

Nonostante gli sforzi messi in atto dai Paesi europei fin dagli anni '90 per mitigare l'inquinamento da ozono attraverso la riduzione delle emissioni antropogeniche dei precursori, le concentrazioni di tale inquinante nelle aree urbane e rurali dell'Europa non mostrano alcun trend di diminuzione. In tale situazione, le eccedenze rispetto ai valori standard definiti dall'Unione Europea per la protezione della vegetazione e della salute umana (Directive 2008/50/EU) restano elevate e diffuse, tali che ampia parte della superficie coltivata e delle foreste in Europa risulta esposta a livelli potenzialmente dannosi (EEA, 2009) (Figura 1.1).

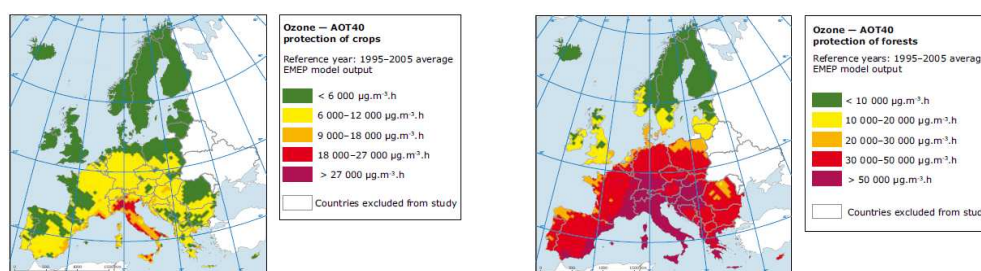


Figura 1.1. Valori medi modellati di AOT40 per colture e foreste per il periodo 1995–2005
(Fonte: EEA Technical report No 7/2009).

Gli effetti fitotossici dell' O_3 sono principalmente connessi al suo elevato potenziale ossidoriduttivo (pari a +2,07 V). I danni alla vegetazione possono essere determinati da una reazione diretta con le biomolecole, che subiscono ossidazione, oppure dall'induzione alla formazione di radicali liberi, in particolare di specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Substances).

Nel determinare il reale impatto dell'ozono sulla vegetazione entrano in gioco diversi fattori quali i livelli dell'inquinante in atmosfera (UN/ECE, 2004), l'assorbimento stomatico (che a sua volta dipende da condizioni ambientali e fisiologiche) (Emberson *et al.*, 2000), le capacità di detossificazione della pianta (Gravano *et al.*, 2004; Castagna & Ranieri, 2009). Le piante sono generalmente soggette a numerosi tipi di stress ambientali. Diagnosi e interpretazione degli effetti di tali stress sono spesso difficoltose per la carenza di conoscenze relative a come il soggetto reagisca alla variazione dei fattori (Niinemets, 2010). La complessità di essi e le loro interazioni possono dunque rendere difficoltosa la possibilità di stabilire una chiara e non ambigua relazione tra ozono e risposta della pianta in condizioni reali di campo. L'uso di bioindicatori può rappresentare una soluzione adatta a superare tali difficoltà. Questi forniscono informazioni sul reale effetto del fattore di stress, sintetizzando la complessità di tutti i processi che agiscono tra l'esposizione ad esso e la risposta dell'organismo. In particolare, quest'ultima riflette sia l'azione dell'insieme dei parametri ambientali che influiscono sull'assorbimento stomatico - cioè sulla quantità di ozono fitotossicamente disponibile - sia il risultato delle strategie di difesa messe in atto per limitare e/o riparare il danno. Pertanto l'uso di un bioindicatore non va visto come strumento per conoscere i livelli dell'inquinante, ma come opportunità per ottenere informazioni complessive sul reale impatto dell'ozono sulla vegetazione (Coulston *et al.*, 2003; Cristofolini *et al.*, 2011). Il suo impiego per valutare l'effetto dell'ozono può essere particolarmente utile in aree remote e in ambiente montano, dove le concentrazioni tendono a essere più elevate e dunque è maggiore il potenziale rischio per la vegetazione.

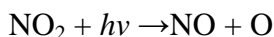
Scopo di questa tesi è esplorare le potenzialità di utilizzo della specie arbustiva *V. lantana* L. come bioindicatore *in situ* per valutare gli effetti dell'ozono sulla vegetazione spontanea.

1.1 L'ozono troposferico

L'ozono (O₃) è un gas formato da tre atomi di ossigeno, dotato di un elevato potere ossidante. Per la maggior parte (circa il 90%) si trova nella stratosfera, lo strato di atmosfera che si estende tra i 15 ed i 50 km di altezza dalla superficie terrestre. Qui si forma per scissione fotolitica dell'ossigeno biatomico ad opera delle radiazioni ultraviolette ad onda corta ($\lambda < 242$ nm) emesse dal sole e successiva ricombinazione dell'ossigeno atomico con l'ossigeno molecolare (meccanismo di Chapman). L'ozono stratosferico ha la funzione importante di proteggere la superficie terrestre dalle radiazioni ultraviolette emesse dal Sole, altrimenti dannose per gli esseri viventi per la loro azione mutagena.

Nella troposfera, lo strato basso dell'atmosfera, la presenza dell'ozono è dovuta in parte al naturale scambio che avviene con la stratosfera e alle scariche elettriche durante i temporali, ma prevalentemente è determinata da processi di formazione dell'inquinante, attraverso complesse reazioni fotochimiche che coinvolgono contaminanti primari - detti anche

precursori - quali gli ossidi di azoto (NO_x) ed i composti organici volatili (COV) o idrocarburi, le cui sorgenti sono per lo più di natura antropica. Per azione delle radiazioni ultraviolette, nella troposfera avviene una serie di reazioni indicata come ciclo fotolitico dell' NO_2 durante la quale si ha continua produzione e successiva degradazione dell'ozono. In particolare il biossido d'azoto si riduce a monossido di azoto liberando ossigeno atomico:



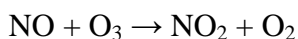
dove $h\nu$ = energia ceduta da fotoni di luce

L'ossigeno atomico si ricombina con l'ossigeno molecolare:



dove M = specie capace di assorbire l'energia vibrazionale in eccesso prodotta dalla reazione e di stabilizzare la molecola di O_3 formatasi.

Il monossido di azoto reagisce quindi con l'ozono riformando biossido di azoto e ossigeno biatomico:



Il risultato netto di questo ciclo è perciò essenzialmente un rapido ricambio di NO_2 a livello della troposfera; tale ricambio è favorito da elevate concentrazioni di NO (Figura 1.2A). Quando nella troposfera sono presenti anche specie chimicamente molto attive quali gli idrocarburi (HC), il suddetto equilibrio viene spostato verso l'aumento dell'ozono attraverso la sottrazione diretta di NO e la formazione di altri composti inquinanti (Figura 1.2B).

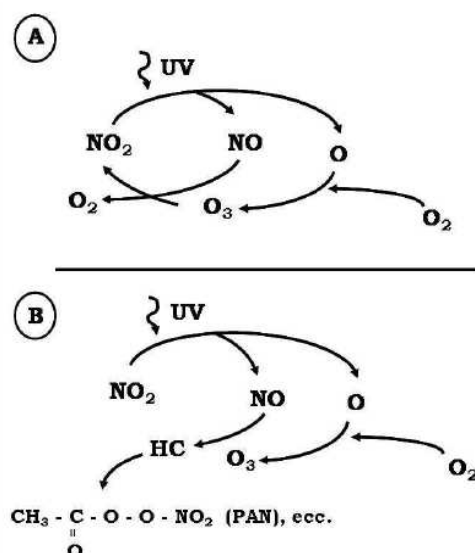


Figura 1.2. A) Ciclo fotolitico indisturbato del biossido di azoto; B) interazione con gli idrocarburi a formare lo smog fotochimico (da Lorenzini e Nali, 2005).

Oltre ai processi descritti, possono contribuire alla formazione di O_3 la fotossidazione del monossido di carbonio (CO), la formaldeide ed altre sostanze organiche non metaniche,

(Fishman *et al.*, 1985). Nonostante la sua produzione avvenga nelle aree urbane, dove prevalentemente si ha l'emissione degli inquinanti primari, è ampiamente accertata la presenza di elevate concentrazioni di O₃ in zone rurali e forestali (Stockwell *et al.*, 1997; Hunova *et al.*, 2011). Il trasporto a lunga distanza dell'ozono e dei suoi precursori sembra essere la causa principale di questo fenomeno (Colbeck & Harrison, 1985). In particolare nelle aree rurali si verifica un accumulo di NO₂, conseguente a movimenti orizzontali delle masse d'aria, in condizioni di assenza o scarsità di NO. Ciò determina un'elevata produzione di ozono il quale però non viene consumato, poiché non avviene la reazione tra O₃ e NO. Di conseguenza i valori più elevati di questo inquinante si raggiungono normalmente nelle zone meno interessate dalle attività umane e dove invece è maggiormente presente la vegetazione, sia coltivata che spontanea.

La concentrazione di O₃ "al suolo" è ad un livello di *background* è pari a circa 20-40 ppb (1 ppb = 1,96 µg m⁻³ a 20 °C e 101,325 kPa). La presenza sua è variabile nell'arco dell'anno e della giornata. Il periodo più critico per la formazione di tale inquinante è tipicamente quello estivo. La Figura 1.3 riporta i valori medi mensili di ozono rilevati da due centraline automatiche della rete di monitoraggio degli inquinanti aerei dell'Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente di Trento (APPA TN, <http://www.appa.provincia.tn.it/aria/>). Sebbene le due stazioni di misura si trovino in ambienti diversi, per quota e uso del suolo, i profili giornalieri sono analoghi ed evidenziano il picco delle concentrazioni centrato sui mesi estivi.

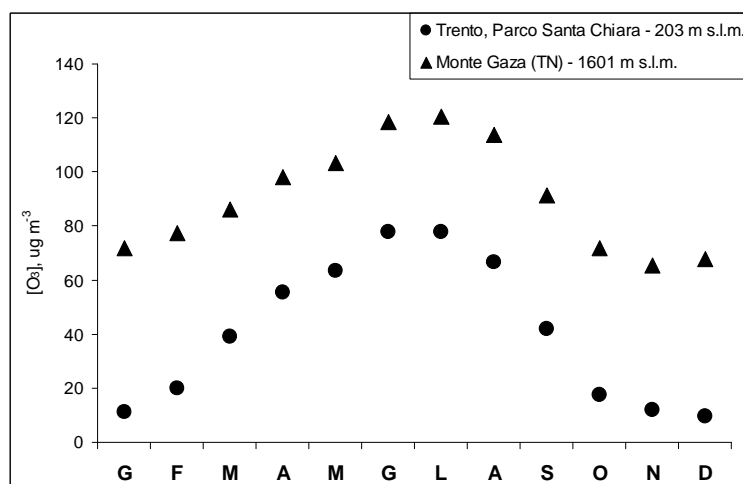


Figura 1.3. Andamento annuale delle concentrazioni medie di ozono registrate in due stazioni della rete di misura degli inquinanti dell'aria della provincia di Trento poste a differenti quote (APPA TN). I valori medi mensili si riferiscono al periodo 1999 - 2009.

Anche l'andamento giornaliero delle concentrazioni di ozono è variabile (Figura 1.4): i valori massimi sono raggiunti generalmente nel pomeriggio, durante le ore più calde della giornata, per poi scendere durante le ore notturne e mattutine; alle quote più elevate il profilo

giornaliero tende ad appiattirsi e le concentrazioni restano costantemente elevate nel corso delle 24 ore, con un leggero calo durante il mattino.

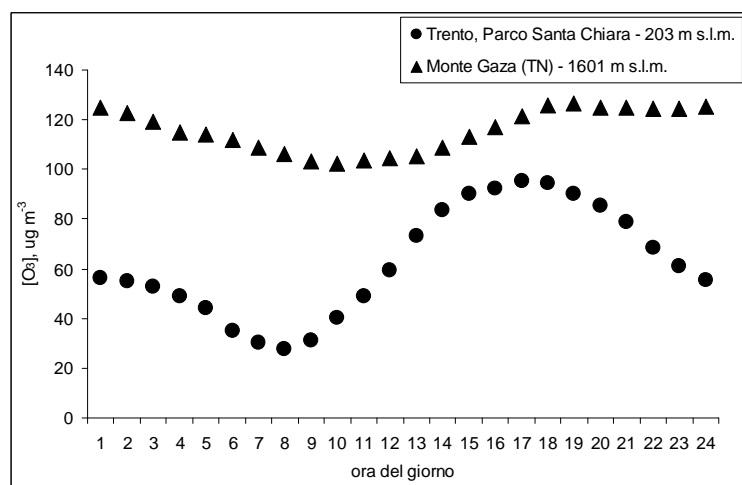


Figura 1.4. Andamento giornaliero delle concentrazioni medie di ozono registrate in due stazioni della rete di misura degli inquinanti dell'aria della provincia di Trento poste a differenti quote (APPA TN). I valori si riferiscono al mese di giugno 2011.

Appare evidente che, oltre ad una variabilità nel tempo (andamento giornaliero e stagionale), l'ozono in ambiente montano mostra anche una variabilità nello spazio strettamente dipendente dalla quota (Loibl *et al.*, 1994; Bytnerowicz *et al.*, 2004). Hunova *et al.* (2011) hanno riscontrato un gradiente altitudinale di 4,0 - 5,4 ppb ogni 100 m di quota fino a circa 1.000 m s.l.m..

Nel corso dell'ultimo secolo le concentrazioni di ozono troposferico sono pressoché raddoppiate (Vingarzan, 2004; Derwent *et al.*, 2007) e l'incremento appare particolarmente rilevante dagli anni '50. Scenari di emissione delineati dall'*Intergovernmental Panel on Climate Change* (http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/ts.html) prevedono per il futuro un ulteriore aumento dei valori. Un miglioramento della qualità dell'aria è previsto per il futuro solo nel caso in cui vengano messe in atto le previste misure di controllo delle emissioni degli inquinanti precursori (Giannouli *et al.*, 2011).

1.2 Meccanismi di fitotossicità dell'ozono ed effetti sulla vegetazione

Come già accennato, gli effetti fitotossici dell'O₃ sono principalmente connessi al suo elevato potere ossidante, conseguente al valore del suo potenziale di ossidoriduzione, pari a +2,07 V. La tossicità dell'ozono può essere determinata da una reazione diretta con le biomolecole, che subiscono ossidazione, oppure dall'induzione alla formazione di radicali liberi, in particolare di ROS. Il danno è il risultato di reazioni biochimiche e fisiologiche che avvengono nel mesofillo fogliare, con ripercussioni in tutto l'organismo vegetale. Le tipiche reazioni da ozono consistono in:

- diminuzione del contenuto di clorofilla e del tasso fotosintetico;
- cambiamenti nell'allocazione del carbonio;
- aumento dell'attività antiossidante;
- riduzione della biomassa.

Inoltre, l'ozono appare indebolire la resilienza delle specie vegetali nei confronti di un ampio range di stress biotici ed abiotici (Skarby *et al.*, 1998). Il fattore che incide sulla fitotossicità dell'O₃ è la quantità effettiva d'inquinante che raggiunge i siti reattivi all'interno della foglia. L'ozono penetra principalmente attraverso gli stomi e tale flusso - regolato dalle condizioni chimiche e fisiche che esso incontra durante la transizione dalla fase gassosa a quella liquida - può essere espresso dalla relazione indicata come legge di Fick:

$$F = g * (C_a - C_i)$$

dove "F" rappresenta il flusso, "g" la conduttanza, "C_a" è la concentrazione di ozono all'esterno della foglia e "C_i" quella all'interno, assunta uguale a zero. È dunque evidente che i fattori che maggiormente influenzano il flusso dell'ozono all'interno del mesofillo sono la concentrazione esterna del gas e la conduttanza stomatica.

Date le modalità di assorbimento dell'ozono e i meccanismi con i quali si esplica la sua fitotossicità, le piante possono adottare fondamentalmente due strategie difensive per proteggersi da questo inquinante: (i) esclusione dello stress attraverso la chiusura delle aperture stomatiche (Moldau *et al.*, 2011); la riduzione della conduttanza stomatica può però comportare una diminuzione nell'assorbimento anche della CO₂ e quindi, se prolungata, compromettere il processo fotosintetico; (ii) tolleranza allo stress attraverso l'attivazione di sistemi di detossificazione nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (Sharma & Davis, 1997; Plochl *et al.*, 2000). A livello ultrastrutturale i cambiamenti indotti dall'ozono riguardano la perdita dell'integrità della membrana cellulare e la conseguente riduzione nella capacità di trasportare sostanze chimiche e di mantenere l'omeostasi. Le membrane degli organelli, in particolare quelle dei cloroplasti, sono considerate particolarmente suscettibili al danno da ozono. Come conseguenza del danneggiamento dei cloroplasti si verifica il collasso delle cellule del mesofillo secondo un tipico meccanismo di risposta ipersensibile (HR) generato dall'accumulo di ROS nel citoplasma (Wohlgemuth *et al.*, 2002). Recenti studi hanno dimostrato che l'attivazione di un burst ossidativo e l'induzione di un meccanismo di

risposta ipersensibile da parte dell'ozono sono simili ai meccanismi di difesa delle piante da altri fattori sia biotici - come l'attacco di patogeni (Kangasjarvi *et al.*, 2005) - sia abiotici (eccesso di luce, deficit idrico). Gli effetti fitotossici dell'O₃ si esprimono anche a livello fisiologico. L'attacco della membrana del cloroplasto comporta, infatti, la riduzione dell'attività fotosintetica e l'inibizione dell'attività della Rubisco (enzima Ribulosio bifosfato carbossilasi), riducendo in tal modo la fissazione della CO₂. Secondo alcuni autori questa riduzione è imputabile alla diminuzione della concentrazione di Rubisco nelle foglie piuttosto che ad un decremento del suo stato di attivazione (Fiscus *et al.*, 2005). La riduzione dell'attività fotosintetica determina un decremento nella produzione di zuccheri solubili ed amido. Ciò causa una riduzione della crescita come conseguenza del fatto che tali importanti risorse sono sottratte al processo stesso di crescita ed utilizzate in processi di detossificazione (Guderian *et al.*, 1985).

Gli effetti sulla vegetazione si manifestano a vari livelli di organizzazione biologica ed in diversi modi: come lesioni fogliari, riduzione di vitalità e produttività, aumentata suscettibilità a stress di varia natura, sia biotici che abiotici (Krupa *et al.*, 2001). Danni visibili sulle foglie sono ritenuti la prima - e facilmente riconoscibile - indicazione di stress ossidativo determinato dalla presenza di livelli fitotossici di ozono. La rilevazione dei sintomi fogliari è frequentemente utilizzata per monitorare l'effetto di questo inquinante sulla vegetazione (UN/ECE, 2004; Hunova *et al.*, 2011). L'ozono può anche causare riduzioni nella crescita delle piante arboree con importanti ripercussioni - tra l'altro - sul sequestro di carbonio dall'atmosfera (Wittig *et al.*, 2009). La perdita economica in seguito alla ridotta produzione di biomassa legnosa causata dall'ozono in Svezia è stimata essere di 56 milioni € all'anno (Karlsson *et al.*, 2005). Gli effetti dell'ozono si possono mostrare anche a livello di popolamento: gli individui più sensibili, sui quali l'ozono ha conseguenze negative maggiori, hanno minori capacità di competere per l'approvvigionamento delle risorse e dunque sono destinati ed essere eliminati (Bussotti, 2008).

1.3 Valutazione del rischio ozono per la vegetazione

Per valutare il rischio che l'ozono pone sulla vegetazione si fa comunemente riferimento al concetto di livello critico, inteso come “*la concentrazione atmosferica dell'inquinante al di sopra della quale possono verificarsi effetti negativi sui recettori, come gli esseri umani, le piante, gli ecosistemi ed i materiali, sulla base delle conoscenze attuali*” (UN/ECE, 1996). Il livello critico adottato per l'ozono è basato sull'indice di esposizione cumulativa chiamato AOT40 (Accumulated Ozone exposure Over a Threshold concentration of 40 ppb) e viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{AOT 40} = \sum_{\text{per } [\text{O}_3]_i > 40 \text{ ppb}} ([\text{O}_3]_i - 40)$$

Secondo la direttiva 2008/50/EU relativa alla qualità dell'aria, questo indice rappresenta la sommatoria delle eccedenze delle concentrazioni medie orarie di O₃ al di sopra del valore di 80 µg m⁻³ (circa 40 ppb) tra le ore 8.00 e le ore 20.00, da maggio a luglio. La direttiva stabilisce i valori di AOT40 per la protezione della vegetazione; in particolare, fissa un livello critico di 18.000 µg m⁻³ h (circa 9.000 ppb h) come media di 5 anni da raggiungere nel 2010 e un obiettivo di lungo periodo, non definito come scadenza, di 6.000 µg m⁻³ h (circa 3.000 ppb h) da calcolare sul periodo maggio - luglio. In ambito UN/ECE (UN/ECE, 2004) il livello critico per la protezione delle foreste è stato stabilito pari a 5.000 ppb h per il periodo compreso tra l'1 aprile e il 30 settembre per le ore diurne (radiazione luminosa maggiore o uguale a 50 W m⁻²). Ad esso è associato convenzionalmente un danno pari alla riduzione di biomassa del 5%, riferito a latifoglie ozono-sensibili (faggio e betulla) e in condizioni ambientali sensibili (favorevoli all'assorbimento stomatico di ozono) (Karlsson *et al.*, 2004).

Negli ultimi anni nella comunità scientifica si è ampiamente discusso sulla possibilità di sostituire, per la valutazione del rischio ozono, gli indici di esposizione con modelli di flusso stomatico cumulato (Mills *et al.*, 2011). Se l'uso dei flussi stomatici può risultare concettualmente più appropriato perché consentirebbe di stimare quanto ozono entra nella pianta, va tuttavia tenuto in considerazione che i modelli per stimare tali flussi richiedono delle assunzioni e la necessità di stimare una serie di parametri tali che l'errore associato alla stima finale del flusso stomatico risulta sconosciuto (Ferretti *et al.*, 2007b) e comunque di difficile quantificazione (Gerosa & Anfodillo, 2003).

Il monitoraggio dell'ozono in l'Europa è stato avviato con una certa sistematicità alla fine degli anni '80 (Matyssek & Innes, 1999). Dal 2001 il Programma *EU and UN/ECE ICP Forests* ha lanciato una fase sperimentale per il monitoraggio dell'ozono nelle sue aree forestali per ovviare al fatto che la maggior parte dei dati disponibili a livello europeo riguardano aree urbane, suburbane ed industriali, dove le misure sono ottenute tramite centraline automatiche. Tale fase sperimentale si basa su misure delle concentrazioni atmosferiche di ozono con l'impiego di campionatori passivi e sulla valutazione dei danni

visibili sulla vegetazione. Le concentrazioni registrate in siti forestali italiani sono risultate tali da determinare il superamento dei limiti stabiliti per la protezione delle foreste (Bussotti & Ferretti, 2009).

1.4 I livelli di ozono in Trentino: il contesto in cui si colloca lo studio

L'attività sperimentale in campo è stata svolta sul territorio della provincia di Trento. Tale studio si colloca all'interno di un progetto quinquennale più ampio (*Ozone EFFORT*) (Gottardini *et al.*, 2011a) - svolto con il contributo e la collaborazione del Servizio Foreste e Fauna e dell'Agenzia Provinciale per la protezione dell'Ambiente della Provincia Autonoma di Trento - che ha l'obiettivo di comprendere se i livelli di ozono in Trentino siano tali da costituire un rischio potenziale per la vegetazione e, in caso affermativo, se siano riscontrabili effetti sulla vegetazione (Figura 1.5).

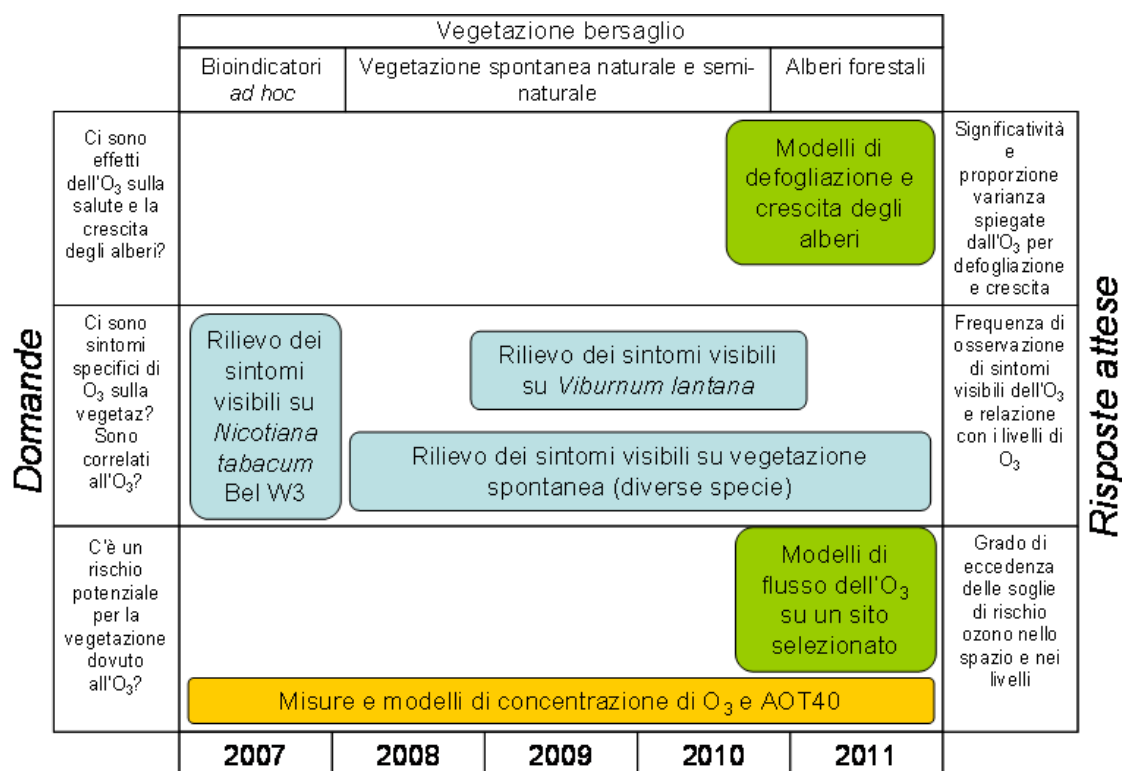


Figura 1.5. Schema del progetto *Ozone EFFORT* nell'ambito del quale si colloca lo studio specifico su *V. lantana*, oggetto della tesi.

Tre i quesiti ai quali si cerca di dare una risposta attraverso la realizzazione del progetto *Ozone EFFORT*:

1. C'è un rischio potenziale per la vegetazione in Trentino dovuto all'ozono?
2. Ci sono sintomi specifici sulla vegetazione, correlabili all'ozono?

3. Ci sono effetti sulla salute e sugli accrescimenti degli alberi imputabili all'ozono?

Per rispondere alla prima domanda era necessario conoscere i reali livelli di ozono sull'intera superficie provinciale. I dati disponibili si riferivano a quelli misurati dalle centraline automatiche dell'Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente di Trento (APPA TN, <http://www.appa.provincia.tn.it/aria/>), collocate prevalentemente in area urbana e in fondovalle, tranne quella del Monte Gaza posta a 1.601 m s.l.m.. I dati di quest'ultima e quelli rilevati al Passo Lavazè nell'ambito del programma CONECOFOR (Ferretti *et al.*, 2003) evidenziavano la presenza di concentrazioni elevate di O_3 , ma non esistevano misure sistematiche in aree forestali capaci di fornire informazioni sull'effettiva distribuzione territoriale di questo inquinante. Pertanto, nel 2007 è stata avviata una serie di campagne di misura delle concentrazioni di ozono installando campionatori passivi (PASSAM AG, <http://www.passam.ch/ozone.htm>) presso i 15 siti di monitoraggio delle condizioni dei boschi che ricadono sul territorio provinciale delle foreste (rete UE-UN/ECE di Livello I; densità nominale: 1 punto ogni 225 km², corrispondente ad una rete di circa 15x15 km); le misure sono state estese nel 2009 ad altri 5 siti forestali, allo scopo di rendere più uniforme la copertura del territorio provinciale (Figura 1.6).

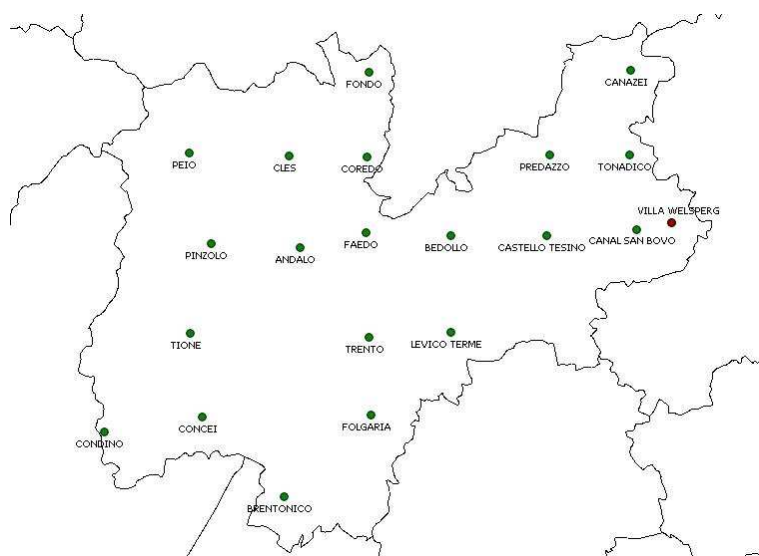


Figura 1.6. Dislocazione dei siti di misura dell' O_3 con campionatori passivi in provincia di Trento per il progetto *Ozone EFFORT*.

I campionatori passivi per la misura dell'ozono sono costituiti da fiale in polipropilene con un filtro in fibra di vetro imbevuto con soluzione di acido acetico e 1,2-di(4-piridil)-etilene, che reagisce con l'ozono entrato nel campionatore per diffusione. La reazione comporta la formazione di un'aldeide, la cui determinazione quantitativa mediante spettrofotometria (a 442 nm) consente di risalire alla concentrazione media oraria settimanale di ozono, espressa in $\mu\text{g m}^{-3}$. Le concentrazioni di ozono vengono convertite da $\mu\text{g m}^{-3}$ a ppb, applicando il

coefficiente di conversione di 1,9632 riferito a condizioni di pressione e temperatura standard. Per le stime dei valori di esposizione (AOT40) è stata utilizzata una funzione lineare applicata ai valori medi settimanali di concentrazione di ozono (Ferretti *et al.*, in prep.).

Sulla base delle misure di ozono, ripetute dal 2007 al 2011 nei periodi maggio – luglio, è stato possibile, attraverso approcci modellistici e di geostatistica, spazializzare le concentrazioni di ozono e l'AOT40 a livello provinciale con risoluzione unichilometrica (Bacaro *et al.*, 2008). Questo lavoro ha evidenziato diffusi e frequenti superamenti dei livelli di ozono ritenuti potenzialmente dannosi per la vegetazione (Figura 1.7) (Gottardini *et al.*, 2009; Gottardini *et al.*, 2010b; Gottardini *et al.*, 2011b). Da una valutazione conservativa è infatti emerso che, se si considera il valore obiettivo per il 2010 della direttiva 2008/50/CE dell'Unione Europea per la protezione della vegetazione (9.000 ppb h), circa il 10% della superficie forestale trentina è esposta a valori di ozono potenzialmente dannosi; questa percentuale sale al 57% e all'83% se si considerano rispettivamente i livelli critici UN/ECE (5.000 ppb h) e la soglia di rischio stabilita dall'Unione Europea come obiettivo di lungo termine per la protezione della vegetazione (3.000 ppb h).

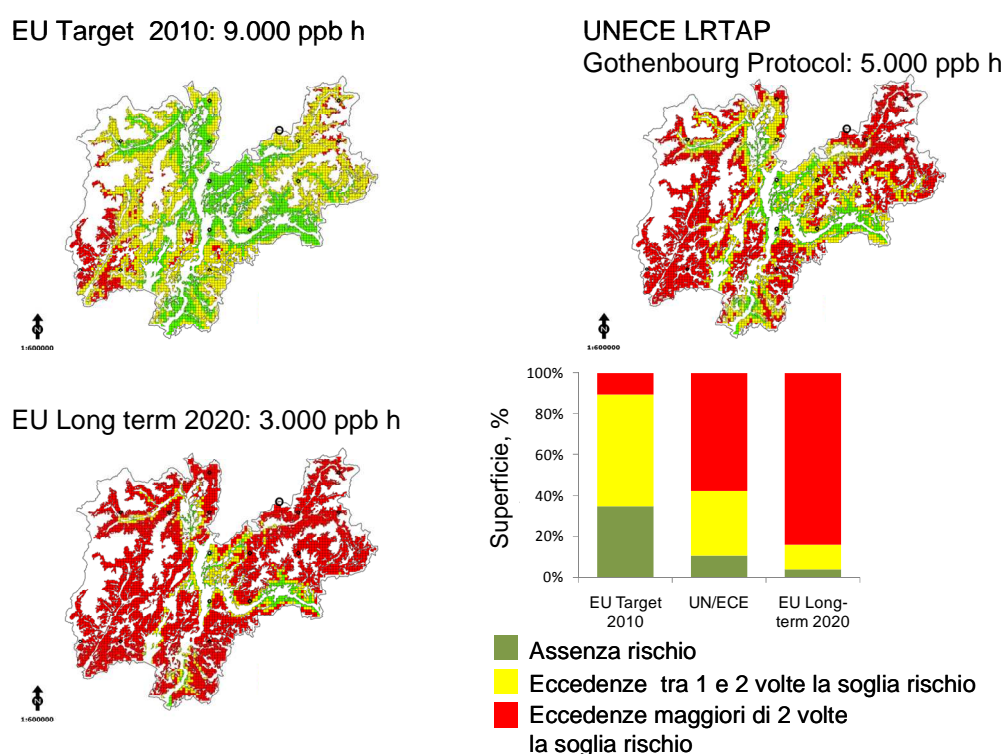


Figura 1.7. Mappe di rischio ozono per la vegetazione del Trentino elaborate sulla base dei dati di concentrazione di ozono misurati nel 2007 e modellati per tutta la provincia. I limiti presi a riferimento sono quelli stabiliti dalla direttiva 2008/50/CE dell'Unione Europea e dall'UN/ECE.

Conseguentemente sono stati intrapresi studi specifici mirati a verificare se tali livelli di ozono erano in grado di provocare effetti misurabili sulla vegetazione. Si è dunque proceduto

per passi successivi, prendendo inizialmente in considerazione una pianta notoriamente supersensibile all'ozono, la cultivar di tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) Bel-W3 (Cristofolini *et al.*, 2011). Le piante di tabacco sono state esposte secondo un disegno sperimentale basato su un approccio statistico che permette di escludere errori dovuti a criteri soggettivi di scelta delle aree di studio e a controllare gli errori campionari. Lo studio ha permesso di verificare che i livelli di ozono in Trentino sono tali da causare un danno alla vegetazione sensibile, proporzionale alle concentrazioni misurate. Il passo successivo è stato quello di capire cosa accade alla vegetazione spontanea. Pertanto, negli anni 2008-2011 sono state condotte una serie di campagne di osservazione in siti forestali mirate a verificare se vi fossero sintomi fogliari sulla vegetazione spontanea imputabili all'ozono; i rilievi sono stati effettuati riferendosi alla metodica ICP Forests (Submanual for the Assessment of Ozone Injury on European Forest Ecosystems - Intensive Monitoring Plots Level II - <http://www.ozoneinjury.org>). Nei siti di Livello I considerati nello studio e nei siti di Livello II di Passo Lavazè (TN), nessuna delle specie legnose rilevate ha mostrato sintomi attribuibili all'ozono. Al fine di valutare in maniera più esaustiva i possibili effetti dell'ozono sulle foreste in Trentino, è in corso uno studio correlativo sull'accrescimento e lo stato di salute delle piante forestali in relazione ai livelli di inquinante.

Il lavoro svolto con questa tesi sulla specie ozono-sensibile *V. lantana* s'inserisce nella serie di studi realizzati nell'ambito del progetto *Ozone EFFORT* che hanno lo scopo di comprendere i reali effetti dell'ozono sulla vegetazione in Trentino.

1.5 Il biomonitoraggio dell'ozono

Sviluppo di sintomi fogliari, alterazioni nell'accrescimento e nella capacità riproduttiva, ridotta vitalità sono alcune delle possibili conseguenze per le piante dell'esposizione all'ozono. Tali effetti possono essere considerati come indicatori di risposta attraverso i quali riconoscere e misurare l'azione dell'ozono sulla vegetazione. S'introduce così il concetto di monitoraggio biologico, cioè l'uso di organismi per ottenere informazioni sulla qualità dell'ambiente attraverso l'osservazione e l'analisi di indicatori di risposta. Il biomonitoraggio, che si basa sulla sensibilità di un organismo nei confronti di uno o più inquinanti, è un possibile approccio per stimare l'effetto complessivo di tali fattori di stress su comunità biologiche (Markert, 2007; Sawidis *et al.*, 2011). Tale sistema di analisi valuta gli effetti integrati dell'inquinamento e dei fattori che possono intervenire a modificare la risposta delle piante agli inquinanti (fattori ambientali, stato fisiologico). I requisiti per poter considerare un organismo come buon bioindicatore sono (Doley, 2010):

- (i) ampia diffusione sul territorio;
- (ii) elevata e documentata sensibilità all'inquinante;
- (iii) specificità della risposta all'inquinante;

- (iv) capacità di rispondere all'inquinante durante tutto il periodo vegetativo;
- (v) risposta quantitativa in relazione con i livelli di esposizione all'inquinante.

Vi sono specie che rispondono a tali requisiti e possono dunque essere utilizzate come indicatrici per ottenere informazioni sulla presenza e sugli effetti di livelli fitotossici di ozono. Da quasi cinquant'anni il biomonitoraggio dell'ozono viene realizzato impiegando la cultivar ozono-sensibile di tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) Bel-W3 (Krupa *et al.*, 1993; Klumpp *et al.*, 2006; Nali *et al.*, 2006): questa pianta sviluppa tipiche lesioni fogliari che consistono in necrosi bifacciali grigiastre distribuite sulla lamina fogliare. La concentrazione soglia necessaria per lo sviluppo di sintomi è di 40–50 ppb per esposizioni di circa 5 ore, di 30 ppb per 8 ore (Heggestad, 1991). Solitamente si utilizzano piante adulte che restano esposte per circa 4 settimane. Personale ben addestrato rileva le percentuali di superficie fogliare danneggiata per il calcolo del *Leaf Injury Index* (LII). L'intera procedura è stata standardizzata ed è contenuta in una norma messa a punto da VDI (Verein Deutscher Ingenieure) (VDI, 2003). Una metodica alternativa, messa a punto dall'Università di Pisa (Lorenzini, 1994), prevede l'uso di germinelli (prima foglia lunga 1 cm) al posto delle piante adulte. I germinelli, organizzati in kit miniaturizzati, vengono esposti all'aria ambiente per brevi periodi (7 giorni). Utilizzando tali kit, sono stati svolti diversi studi ambientali su livelli ed effetti dell'ozono (Lorenzini *et al.*, 1995b, a).

Altro bioindicatore, diffuso a livello internazionale, è la cultivar di trifoglio *Trifolium repens* cv Regal (<http://icpvegetation.ceh.ac.uk/>), con i due cloni NC-S e NC-R, rispettivamente ozono-sensibile ed ozono-resistente. Questi, testati negli Stati Uniti, mostrano differenze nella crescita in seguito ad esposizione all'ozono, mentre rispondono in modo analogo ad altri fattori che influenzano la crescita delle piante. La crescita del clone ozono-sensibile NC-S è inferiore a quella del clone ozono-resistente NC-R quando le piante sono esposte ad alti livelli di ozono. Tale metodica di valutazione degli effetti dell'ozono sembra essere meno soggettiva di quella basata sulla stima dei danni fogliari. (Heagle *et al.*, 1994). Essa è stata adottata per studi sugli effetti dell'ozono su coltivazioni e piante non legnose nell'ambito del framework ICP-Vegetation del UN/ECE International Cooperative Programme (Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution).

La ricerca di un ulteriore bioindicatore per l'ozono ha portato all'individuazione della Solanacea *Lycopersicon pimpinellifolium* (Iriti *et al.*, 2006). Si tratta di una pianta selvatica nativa del Sud America, che può essere facilmente coltivata.

Per quanto riguarda l'uso di piante arboree nel biomonitoraggio dell'ozono, i cloni di pioppo *P. maximowiczii* Henry x *P. x berolinensis* Dippel (nome breve: *Oxford clone*) e *Populus x euramericana* (Dode) Guinier cv. Dorskamp sono attualmente utilizzati nel progetto PO3PLAR (http://www.wsl.ch/fe/walddynamik/projekte/po3plar/index_EN) come complemento del programma di valutazione dei danni da ozono presso i siti di monitoraggio

delle foreste di Livello II svolto dal gruppo di lavoro *Ambient Air Quality* dell'ICP-Forests, il programma di monitoraggio delle foreste a livello europeo (International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests) istituito dalla United Nations Economic Commission for Europe (UN/ECE).

Gli esempi di biomonitoraggio fino ad ora illustrati si riferiscono ad un approccio cosiddetto “attivo”, che prevede l'esposizione *ad hoc* di piante indicatrici nei siti dove si intende monitorare gli effetti dell'inquinante. Non sempre è però possibile estendere i risultati ottenuti con i bioindicatori attivi alla vegetazione naturale e semi-naturale a causa delle differenze genetiche, della composizione della comunità ma soprattutto degli adattamenti ambientali. Inoltre il comportamento dei bioindicatori attivi potrebbe essere influenzato anche dal radicale cambiamento delle condizioni in seguito all'esposizione. Pertanto, per monitorare gli effetti dell'ozono sulla vegetazione spontanea alcuni autori (Chappelka *et al.*, 1999; Manning *et al.*, 2002; Davis & Orendovici, 2006; Paoletti *et al.*, 2009) suggeriscono l'uso di piante *in situ*. Tale approccio potrebbe garantire una risposta delle piante solo al verificarsi di condizioni ambientali favorevoli all'assorbimento stomatico di una quantità tale di ozono - e per un tempo sufficientemente lungo - da determinare l'inattivazione (o il superamento) dei meccanismi di difesa delle piante (Manning *et al.*, 2002). Inoltre le piante spontanee sono già ben adattate all'ambiente e non dovrebbero quindi subire stress aggiuntivi dovuti al trapianto e/o alle variazioni delle condizioni ambientali.

Un esempio, a questo proposito, è rappresentato dalla specie erbacea *Centaurea jacea*, spontanea in gran parte d'Europa. Recentemente è stato sviluppato dall'UNECE International Cooperative Programme on Vegetation un protocollo per l'utilizzo di questa pianta per valutare gli effetti dell'esposizione all'ozono (Mills *et al.*, 2005).

Programmi di biomonitoraggio basati sull'osservazione di specie spontanee sono stati sviluppati in Europa e Stati Uniti (Coulston *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007; Waldner *et al.*, 2007; Bussotti & Ferretti, 2009).

Rispetto al biomonitoraggio attivo, l'uso di specie spontanee come bioindicatori (biomonitoraggio “passivo”) offre alcuni vantaggi pratici, ad esempio per studi in aree remote e su larga scala, dove il mantenimento di piante esposte *ad hoc* sarebbe - tra l'altro - difficoltoso. Occorre però tenere in considerazione che l'uso di specie spontanee introduce anche alcuni elementi di “disturbo”, quali la variabilità genotipica e fenotipica all'interno della specie, che possono comportare una certa variabilità nella risposta del bioindicatore e dunque difficoltà nell'interpretazione dei risultati (Falla *et al.*, 2000). Tali fattori possono però essere in parte controllati adottando un appropriato disegno sperimentale (Ferretti & Cozzi, 2002; Bussotti *et al.*, 2005) ed implementando procedure di *Quality Assurance* negli studi di biomonitoraggio (Ferretti *et al.*, 2009; Ferretti, 2011); ciò è necessario per poter ottenere dati affidabili, comparabili e ripetibili, sulla base dei quali trarre conclusioni sostenibili.

D'altra parte, l'incorporazione della variabilità della risposta derivante dal bioindicatore è coerente con il concetto che sta alla base dell'uso di specie spontanee, cioè la possibilità di stimare le risposte della vegetazione effettivamente presente. L'uso del bioindicatore passivo non mira a conoscere i livelli di ozono ma piuttosto a comprendere il reale impatto sulla vegetazione.

1.6 La specie ozono-sensibile *Viburnum lantana* L.: rispondenza ai requisiti di un bioindicatore

Per la realizzazione della ricerca è stata scelta la specie arbustiva *V. lantana* L. Il motivo della scelta di questa specie risiede nella sua rispondenza ai primi tre requisiti di un bioindicatore.

Questa pianta appartiene alla Famiglia delle Caprifoliacee (Tabella 1.1), ha portamento cespuglioso ed è alta 1 - 3 m. I rami giovani sono pubescenti per peli stellati; i rami terrestri sono radicanti. Le foglie sono opposte, brevemente picciolate con lamina ovale - lanceolata o ellittica, appuntita, dentellata, rugosa e verde scuro nella pagina superiore, più chiara e con fitta pubescenza in quella inferiore. I fiori sono ermafroditi e riuniti in corimbi terminali di circa 1 dm di diametro; il calice è verde a cinque denti, la corolla bianca, campanulata, divisa in cinque punte ovali; i cinque stami hanno filamenti bianchi e antere gialle, i germogli sono rosa. I frutti sono drupe ovali che racchiudono un nocciolo marrone e piatto; a seconda del grado di maturazione variano dal verde, al rosso, al nero. Fiorisce tra aprile e maggio (Pignatti, 1982) (Figura 1.8).

Tabella 1.1. Inquadramento tassonomico di *V. lantana* L.

Regno	Piante
Subregno	Tracheobionta
Divisione	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Asteridae
Ordine	Dipsacales
Famiglia	Caprifoliaceae
Genere	<i>Viburnum</i> L.
Specie	<i>Viburnum lantana</i> L.
Nomi volgari it.	lantana, lentaggine, viburno
Nome volgare en.	wayfaring tree



Figura 1.8. Fiori e frutti di *V. lantana* L.

Rispondenza al requisito (i): ampia diffusione sul territorio

V. lantana è piuttosto diffusa nel Nord America, dove è considerata specie aliena potenzialmente invasiva (http://carolinian.org/Documents/student_assistantship_program/Reports/Invasive%20Alien%20Species%20Found%20in%20Carolinian%20Zone.pdf); è diffusa nelle regioni calde dell'ovest, centro e sud Europa (Kollmann & Grubb, 2002); in Italia è presente nelle regioni centro settentrionali (Figura 1.9); vegeta sino a 1.000 m s.l.m. su pendii rocciosi, in boschi caducifogli termofili (soprattutto *Quercetum pubescentis*), specialmente ai margini e in zone assolate, su suoli magri e ricchi di calcio.

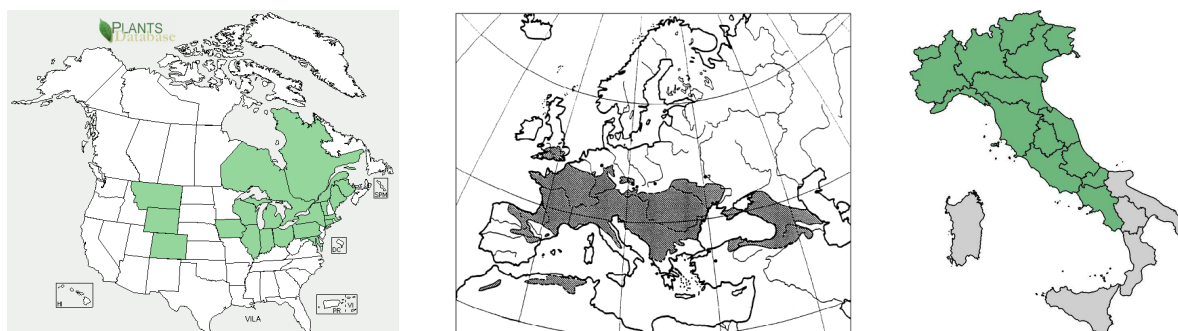


Figura 1.9. Distribuzione di *V. lantana* L. in USA (United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service; <http://plants.usda.gov/java/>), in Europa (Kollmann & Grubb, 2002) e in Italia (Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste - Progetto Dryades; <http://www.dryades.eu/home1.html>).

Anche in Trentino, territorio sul quale sono stati svolti gli studi in campo di questa tesi, la specie è ampiamente presente (Figura 1.10).

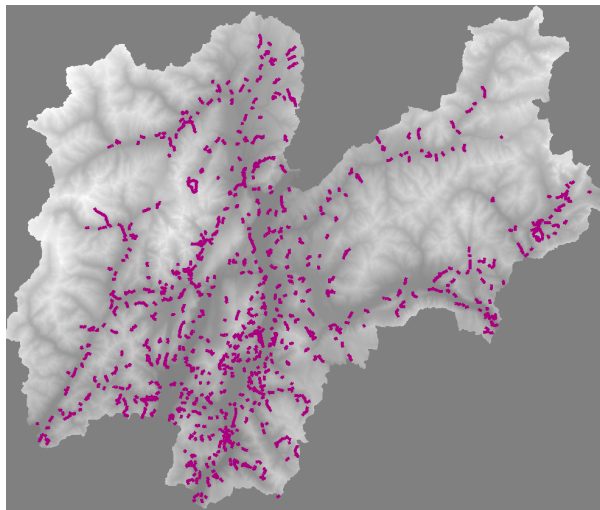


Figura 1.10. Segnalazioni di *V. lantana* in Trentino (da: Cartografia Floristica del Trentino, Museo Civico di Rovereto).

Rispondenza ai requisiti (ii) e (iii): elevata e documentata sensibilità all'inquinante e specificità di risposta

V. lantana è una specie nota per la sua sensibilità all'ozono troposferico, verificata attraverso numerosi studi svolti in ambiente controllato (VanderHeyden *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 2003; Orendovici *et al.*, 2003; Gravano *et al.*, 2004; Novak *et al.*, 2008). In risposta all'esposizione a questo inquinante manifesta un peculiare quadro sintomatico fogliare che consiste in punteggiature (stipples) internervali di colore da rosso-scuro a bruno-neri che si sviluppano sulla faccia adassiale della lamina fogliare (Figura 1.11). Le stipules corrispondono a gruppi di cellule necrotiche nel parenchima a palizzata; tali cellule tendono ad accumulare metaboliti ed a collassare, assumendo una tipica forma ad "osso". Spesso le punteggiature sono associate ad un diffuso arrossamento; l'intensità dei sintomi tende ad aumentare nel tempo ed interessa prevalentemente le foglie più vecchie (Innes *et al.*, 2001).

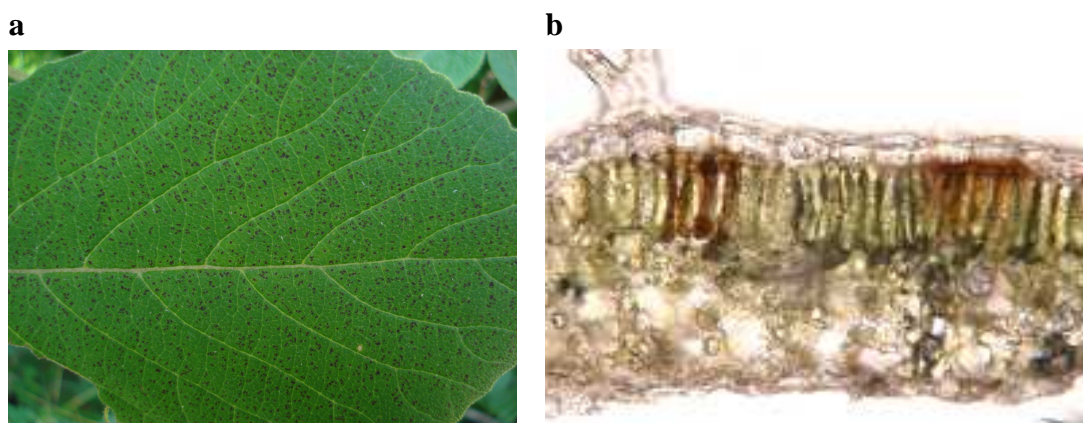


Figura 1.11. Tipici sintomi fogliari imputabili all’ozono L. su *V. lantana* (a) e sezione al microscopio ottico di mesofillo di foglia sintomatica (b).

In Tabella 1.2 sono riportati i principali studi condotti su questa specie in relazione alla sua sensibilità all’ozono, specificando le condizioni sperimentali, i parametri analizzati e i principali risultati ottenuti.

Tabella 1.2. Rassegna dei principali studi condotti su piante di *V. lantana* esposte a ozono. OTC = Open Top Chamber; AA = aria ambiente.

Letteratura di riferimento	Condizioni sperimentali	Parametro analizzato	Risultati principali
Skelly <i>et al.</i> , 1998	Fumigazione di specie autoctone (piantine) con O ₃ 30, 60, 90, 120 ppb per 7 ore/giorno, 5 gg/settimana, 5 settimane	Sintomi fogliari	Piante con sensibilità all'O ₃ decrescente: <i>V. lantana</i> > <i>Morus nigra</i> > <i>Betula pendula</i> = <i>Rumex acetosa</i> > <i>Prunus serotina</i>
VanderHeyden <i>et al.</i> , 2001	OTC: camere filtrate con riduzione dell'O ₃ ambiente del 50%; camere non filtrate	Percentuale di foglia sintomatica; Percentuale di foglie sintomatiche per pianta	Comparsa di sintomi più precoce in camere non filtrate; <i>V. lantana</i> (con <i>Prunus serotina</i> e <i>Rhamnus catartica</i>) è una delle specie con maggior sensibilità
Zhang <i>et al.</i> , 2001	AA, OTC filtrate (O ₃ =0,5xAA) e non (O ₃ =0,96xAA); 10 specie arboree e arbustive	Sintomi fogliari (SF); Fotosintesi netta (FN); Scambi gassosi (SG); Conduttanza stomatica (CS)	<i>V. lantana</i> è tra le specie che mostra più marcatamente SF, riduzione di FN e CS
Remic <i>et al.</i> , 2002	9 popolazioni di <i>V. lantana</i> raccolte <i>random</i> in Slovenia e trapiantate in un sito rurale ed in un sito urbano	Sintomi fogliari; pigmenti fotosintetici; acido ascorbico	Assenza di sintomi su <i>V. lantana</i> ; Aumento di ac. ascorbico e carotenoidi (indice di maggior stress ossidativo) nel sito rurale
Bussotti <i>et al.</i> , 2003	AA; piante spontanee	Sintomi fogliari	<i>V. lantana</i> (con <i>Fraxinus excelsior</i> e <i>Populus nigra</i>) sviluppa i danni più intensi (% di foglie danneggiate, % di superficie fogliare sintomatica)
Orendovici <i>et al.</i> , 2003	Fumigazione di specie spontanee con 30, 60, 90, 120 ppb O ₃ per 7 ore/giorno, 5 giorni/settimana	Percentuale di superficie fogliare danneggiata	<i>V. lantana</i> è una delle specie più sensibili all'O ₃ ; AOT40 soglia per lo sviluppo di sintomi = 1.189 ppb h
Novak <i>et al.</i> , 2003	AA, OTC filtrate (O ₃ =0,5xAA) e non filtrate; 12 specie arboree e arbustive	Percentuale di superficie fogliare danneggiata per pianta; percentuale di foglie sintomatiche per pianta	<i>V. lantana</i> è una delle sp. più sensibili con alta % individui sintomatici; i sintomi iniziano a fine mag (2001) - metà lug (2000) con 4.000 e 12-14.000 ppb h rispettivamente; a fine stagione 15% di superficie fogliare è danneggiata

Letteratura di riferimento	Condizioni sperimentali	Parametro analizzato	Risultati principali
Gravano <i>et al.</i> , 2004	OTC filtrate ($O_3=0,5 \times AA$) e non ($O_3=0,92 \times AA$); 3 specie arboree e arbustive (<i>V. lantana</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Prunus avium</i>)	Sintomi fogliari; struttura anatomica dei sintomi; fluorescenza della chl <i>a</i> ; scambi gassosi fogliari	<i>V. lantana</i> sviluppa arrossamenti per accumulo di antociani; i sintomi appaiono a giugno e raggiungono il picco in agosto; <i>V. lantana</i> evidenzia alterazione strutturale dei cloroplasti e prematura senescenza; l'efficienza fotosintetica decresce progressivamente; si ha diminuzione di PI_{ABS} , Φ_{PO} , ψ_0 , RC/CS_0 e aumento di V_J e V_I
Bussotti <i>et al.</i> , 2005	AA con elevato O_3 (media aprile-settembre: $57,8-73,8 \mu l l^{-1}$); 5 specie legnose	Sintomi fogliari e microscopici; fluorescenza della chl <i>a</i> (OJIP test); microimmagini, microspettrofluorimetria	<i>V. lantana</i> mostra sintomi a fine luglio (con valori di $AOT40 > \text{livelli critici}$) Allo sviluppo dei sintomi, <i>V. lantana</i> mostra riduzione di ψ_0
Bussotti <i>et al.</i> , 2006	Piante arboree, arbustive ed erbacee in vivaio e in campo	Sintomi fogliari; validazione e qualità dei dati acquisiti nell'ambito del 4th UN/ECE ICP-Forests Intercalibration Course	Concordanza del 63,6% con il team di esperti nell'attribuzione dei sintomi da O_3 per <i>V. lantana</i>
Novak <i>et al.</i> , 2007	AA, OTC filtrate ($O_3=0,36 \times AA$) e non ($O_3=0,92 \times AA$); 3 specie (<i>Populus nigra</i> , <i>V. lantana</i> , <i>Fraxinus excelsior</i>)	Anelli di accrescimento annuale; $\delta^{13}C$ negli anelli; scambi gassosi fogliari; sintomi	In AA e OTC filtrata <i>V. lantana</i> sviluppa sintomi fogliari a fine maggio-inizio giugno; In <i>V. lantana</i> O_3 non riduce gli anelli di accrescimento
Novak <i>et al.</i> , 2008	AA, OTC ($O_3=0,47 \times AA$); 2 specie (<i>Fagus sylvatica</i> , <i>V. lantana</i>) in monocultura e mix	Sintomi fogliari; accrescimento e biomassa	<i>V. lantana</i> sviluppa sintomi prima di <i>F. sylvatica</i> ; <i>V. lantana</i> mostra più sintomi in mix che non in monocultura
Calatayud <i>et al.</i> , 2010	OTC con aria filtrata (CF) e non filtrata più ozono 30 ppb (NF+) per 8 h al giorno per 4 mesi; 2 coppie di specie arbustive sempreverdi e decidue (<i>Pistacia terebinthus</i> vs. <i>P. lentiscus</i> ; <i>V. lantana</i> vs. <i>V. tinus</i>)	Superficie fogliare; sintomi fogliari; scambi gassosi; contenuto clorofilla SPAD; fluorescenza della chl <i>a</i>	<i>V. lantana</i> sviluppa per prima i sintomi, con $AOT40=2755$ ppb; Nelle sp. caducifoglie (<i>V. lantana</i> e <i>P. terebinthus</i>) si ha: - signif. riduzione di assimilazione di CO_2 , conduttanza stomatica, efficienza e capacità di rigenerazione di Rubisco; - alterazione precoce dei parametri di fluorescenza: riduzione di Φ_{PSII} e qP ; O_3 non fa aumentare la superossido dismutasi (SOD)

1.7 Obiettivo della ricerca e struttura del progetto

La presente ricerca mira a studiare le risposte morfologiche, fisiologiche, biochimiche e geniche della specie arbustiva *V. lantana* in relazione all'esposizione allo stress ossidativo da ozono. L'obiettivo generale della ricerca è verificare la possibilità di utilizzare tale specie in programmi di biomonitoraggio *in situ* per valutare l'effetto tossico dell'ozono troposferico sulla vegetazione spontanea. A tale scopo occorre preliminarmente accertare l'esistenza dei requisiti necessari ad un organismo affinché possa essere considerato - e dunque utilizzato - come bioindicatore (vedi capitolo 1.5). Sebbene i requisiti (i) e (ii) e (iii) siano già stati largamente documentati (vedi capitolo 1.6) e dunque sia ben nota la sensibilità di *V. lantana* nei confronti dell'ozono, accertata la specificità delle manifestazioni sintomatiche in termini di danno fogliare e verificata l'ampia diffusione di tale specie, occorre verificare la rispondenza ai requisiti iv) e v): non esiste infatti alcuna documentazione sull'evoluzione temporale delle risposte della pianta nel corso dell'intera stagione vegetativa e nemmeno sulla relazione tra l'intensità delle risposte (morfologiche, biochimiche, fisiologiche e genetiche) ed i livelli di esposizione all'ozono. Occorre inoltre verificare l'intero set di requisiti in condizioni reali di campo e in un'area relativamente ampia, prendendo in considerazione anche indicatori di risposta diversi dal sintomo fogliare.

Per cercare di chiarire questi aspetti fondamentali, la ricerca è stata organizzata in due studi osservazionali, svolti in condizioni reali di campo e su piante spontanee. Entrambi gli studi in campo sono stati svolti in Trentino (nord Italia).

(I) Il primo studio, realizzato nel 2009, mirava a rispondere al seguente quesito: *V. lantana* risponde all'ozono durante tutto il periodo vegetativo? A tal fine sono state effettuate osservazioni e misure su piante spontanee naturalmente esposte a due livelli di ozono, corrispondenti a due aree di dimensioni limitate (1 km²), ripetute regolarmente durante il principale periodo vegetativo (maggio - settembre). Scopo di questo primo studio era l'analisi dell'andamento temporale delle risposte delle piante esposte a due livelli di ozono.

(II) Il secondo studio, realizzato nel 2010, mirava a rispondere al seguente quesito: *V. lantana* manifesta una risposta quantitativa in relazione con i livelli di esposizione all'ozono? A tal fine sono stati effettuati rilievi di frequenza di piante sintomatiche a diversi livelli di esposizione all'ozono e di quota. Con questo studio si è voluto verificare se esiste una relazione significativa tra livelli di esposizione all'ozono (causa) e sintomi fogliari (effetto), in termini di percentuale di piante sintomatiche. Questo secondo studio in campo ha avuto come dominio spaziale l'intera superficie della provincia di Trento.

Allo scopo di approfondire le conoscenze relativamente agli effetti dell'ozono a livello biochimico, fisiologico e genico sulla specie in esame, è stato parallelamente realizzato anche uno studio in ambiente controllato.

(III) Piantе coltivate di *V. lantana* sono state sottoposte a fumigazione con concentrazioni note di ozono (trattato), mentre altrettante piante sono state mantenute alle medesime condizioni ambientali ad esclusione dell'ozono (controllo). Con questo approccio è possibile verificare le risposte delle piante al solo fattore di stress indagato (ozono), escludendo l'interferenza di altre variabili. Le piante sono state analizzate relativamente alle risposte morfologiche (sintomi fogliari ed accrescimenti), fisiologiche (fluorescenza della clorofilla), biochimiche (contenuto fogliare di pigmenti fotosintetici e carboidrati) e geniche (PCR-select). L'ampliamento dello spettro di indicatori di risposta considerato mira non solo ad approfondire le conoscenze circa gli effetti dell'ozono su tale specie, ma anche a capire se vi sia la possibilità di ottenere indicazioni precoci sull'esistenza di situazioni di stress per la pianta, prima della comparsa dei sintomi. Tale opportunità è sottolineata anche da altri Autori (Scebba *et al.*, 2006): variazioni a livello molecolare, cellulare o fisiologico potrebbero infatti essere considerate come biomarker utili ad evidenziare - in maniera precoce - un rapporto di causa-effetto tra l'inquinante e la risposta metabolica della pianta.

Lo studio in ambiente controllato è stato realizzato presso il Dipartimento Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi" dell'Università di Pisa, per quanto concerne sia l'allevamento delle piante ed il trattamento delle stesse con ozono in camera di fumigazione, sia le analisi biochimiche. Le analisi biomolecolari sono state svolte presso il Dipartimento di Genomica e Biologia delle Piantе del Centro Ricerca ed Innovazione della Fondazione Edmund Mach.

2.

PRIMO STUDIO OSSERVAZIONALE IN CAMPO: ANDAMENTO TEMPORALE DEI SINTOMI FOGLIARI E DELLA RISPOSTA FOTOSINTETICA

Verifica del requisito (iv): *Viburnum lantana* risponde all'ozono durante tutto il periodo vegetativo?

2.1 Introduzione

E' accertato dalla letteratura che *V. lantana* è una specie assai diffusa, sensibile all'ozono e che i sintomi fogliari sviluppati in seguito ad esposizione a tale inquinante sono piuttosto specifici e facilmente riconoscibili (vedi capitolo 1.6). La possibilità di impiegare questa specie come bioindicatore è subordinata alla verifica della rispondenza ad altri due requisiti: la capacità di rispondere all'ozono durante la stagione di crescita e in maniera quantitativa rispetto al livello di esposizione all'inquinante. Inoltre, nell'ottica di impiegare tale specie come bioindicatore *in situ*, tutti i suddetti requisiti richiedono di essere verificati in condizioni reali di campo.

Lo scopo di questo primo lavoro è verificare, in condizioni reali di campo, lo sviluppo temporale delle risposte di *V. lantana* all'ozono. Gli indicatori di risposta considerati sono (a) il sintomo fogliare ozono-specifico, (b) il contenuto di clorofilla e (c) la fluorescenza diretta della clorofilla *a*.

(a) E' nota la possibilità di ottenere rapidamente, economicamente e anche su ampie aree, indicazioni sugli effetti d'inquinanti atmosferici attraverso la valutazione dei sintomi fogliari (Doley, 2010; Kivimaenpää *et al.*, 2010; Hunová *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2011). In seguito ad opportuno addestramento degli operatori e utilizzando una guida fotografica di riferimento, il riconoscimento dei sintomi fogliari imputabili all'ozono su *V. lantana* è piuttosto semplice e non lascia dubbi d'interpretazione. Ciò nonostante si tratta sempre di una valutazione soggettiva e pertanto i dati che si ottengono possono risentire di una variabilità legata all'osservatore.

(b) Pur fornendo un indicatore di risposta aspecifico, il contenuto fogliare di clorofilla misurato dallo strumento SPAD è un'altra possibile tecnica per valutare in modo indiretto un eventuale stato di sofferenza della pianta (Lawson *et al.*, 2001; Bindi *et al.*, 2002; Neufeld *et al.*, 2006). Lo strumento utilizzato è portatile e la tecnica su cui si basa non è distruttiva e dunque adatta per studi in campo ripetuti nel tempo sulle stesse piante. In questo lavoro i dati sul contenuto di clorofilla sono messi in confronto con gli altri indicatori analizzati –

maggiormente specifici per l'ozono - al fine di evidenziare eventuali relazioni tra essi e dunque di verificare la possibilità di ottenere indicazioni sull'impatto dell'ozono anche con un indicatore non specifico.

(c) La misura della fluorescenza della clorofilla *a* nel fotosistema II (PSII) è una tecnica particolarmente adatta per studiare gli aspetti fisiologici della fotosintesi e per valutare condizioni di stress nelle piante dovute a varie cause (Maxwell & Johnson, 2000; Willits & Peet, 2001; Redillas *et al.*, 2011). In particolare, l'analisi della cinetica veloce è ampiamente usata per ottenere informazioni sull'efficienza degli apparati fotosintetici. Questa tecnica consente di valutare lo stato fisiologico di campioni fotosintetici e dunque di analizzare gli effetti di vari stress sulle piante, compreso quello dovuto all'ozono (Bussotti *et al.*, 2007; Goumenaki *et al.*, 2010; Bussotti *et al.*, 2011a). Anche in questo caso si tratta di una tecnica non distruttiva, applicabile attraverso l'uso di strumenti portatili e dunque potenzialmente adatta per studi in campo ed in zone remote. Con questo studio si vuole verificare l'applicabilità dell'analisi della cinetica veloce della fluorescenza della clorofilla *a* in condizioni reali di campo, valutando: (i) aspetti metodologici relativi alla rappresentatività del campione analizzato; (ii) la possibilità di identificare parametri di fluorescenza precoci, in grado di evidenziare uno stato di sofferenza della pianta prima della comparsa di sintomi visibili.

2.2 Materiali a Metodi

2.2.1 Disegno sperimentale

Lo studio è stato realizzato in due aree del Trentino, caratterizzate da due distinti livelli di ozono troposferico e selezionate sulla base dei risultati ottenuti con un precedente lavoro realizzato al fine di valutare gli effetti dell'ozono troposferico sulla vegetazione sensibile (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3) (Gottardini *et al.*, 2010a; Cristofolini *et al.*, 2011). Nell'ambito del suddetto lavoro, nel 2007 era stata selezionata un'area delle dimensioni di 15x15 km, situata nella parte centrale della superficie provinciale con l'obiettivo di "coprire" un range di concentrazioni di ozono più ampio possibile su una superficie relativamente ridotta (Figura 2.1). Tutte le N celle uni-chilometriche idonee (N=154) presenti nell'area e ricadenti nella fascia altimetrica sotto i 1.000 m s.l.m. erano state classificate per il livello stimato di ozono sulla base dei dati forniti dalla modellistica Calgrid (TECHNE, 2006). Dei 154 valori medi di ozono predetti dal modello erano stati calcolati il 10° e il 90° percentile, risultati rispettivamente:

- 10° percentile = 77,45 $\mu\text{g m}^{-3}$
- 90° percentile = 110,86 $\mu\text{g m}^{-3}$

Questi valori sono stati assunti come limiti per definire le celle a basso ozono ($n=16$; con valori inferiori al 10° percentile) ed alto ozono ($n=16$; con valori superiori al 90° percentile). Sei (3+3) celle 1x1 km erano state casualmente selezionate tra quelle classificate a basso (3) e ad alto ozono (3) e monitorate per i livelli effettivi dell'inquinante (Figura 2.2).

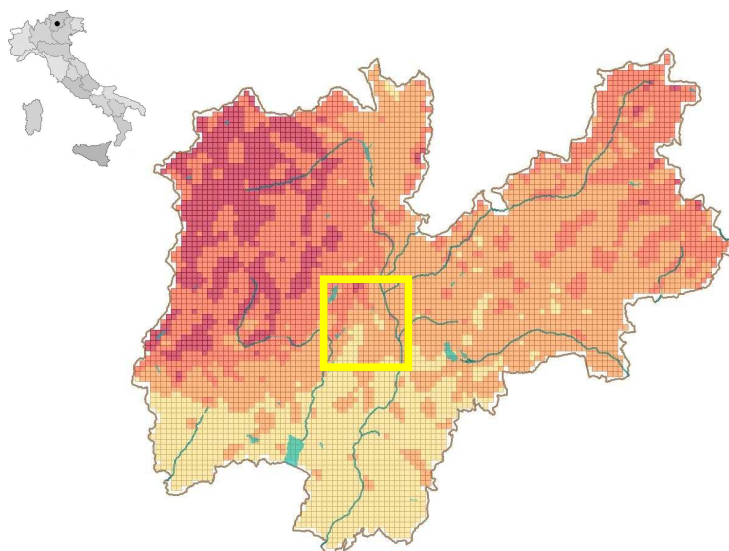


Figura 2.1. Livelli medi di O_3 stimati dalla modellistica Calgrid per 2004 su celle 1x1 km in Trentino. Evidenziata in giallo l'area 15x15 km all'interno della quale sono stati selezionati i quadrati 1x1 km considerati per lo studio.

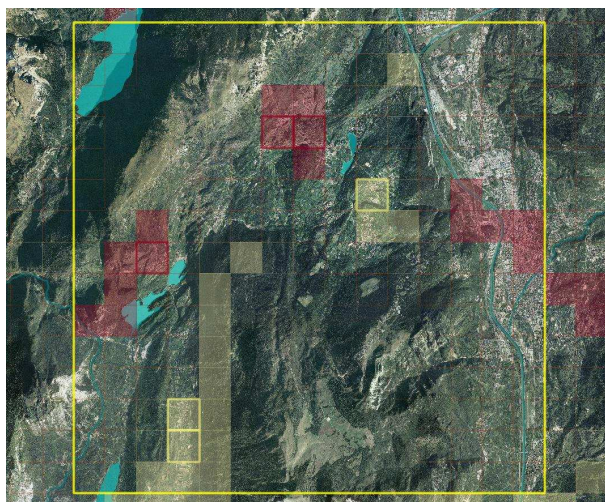


Figura 2.2. Area di studio con celle ad alto (rosso) e basso (giallo) livello stimato di O_3 ; le celle con il bordo evidenziato sono quelle selezionate casualmente dove sono state effettuate le misure delle concentrazioni di ozono.

Il quadrato con i valori più bassi (in località Lasino) e quello con i valori più alti (in località Margone) di concentrazione di ozono sono stati selezionati per il presente lavoro (Tabella 2.1). I due quadrati distano tra loro circa 3 km. Un'area di un chilometro quadrato è considerata piuttosto omogenea per quanto riguarda le concentrazioni di ozono (Gottardini *et al.*, 2010a). All'interno di ogni quadrato, sono state selezionate in maniera casuale tre aree aperte (= Repliche) tra quelle lungo il cui margine era presente un numero minimo di piante di *V. lantana* ($N \geq 10$). Per area aperta s'intende una radura nella vegetazione la cui ampiezza minima sia almeno pari al doppio dell'altezza dell'ostacolo più prossimo. Per ciascun'area aperta sono state selezionate casualmente n piante, dove $n = N/100 \times 20$; se $n < 10$, il numero di piante considerate è stato arrotondato per eccesso a 10.

Per ciascuno dei due quadrati è stata selezionata casualmente una delle tre repliche (L6, M8; vedi Tabella 2.1); in ciascuna delle due repliche sono state individuate casualmente 6 piante tra tutte quelle selezionate per lo studio. Su ogni pianta sono state scelte casualmente 5 foglie ben sviluppate alla cui base è stata applicata un'etichetta in modo da marcarle permanentemente. Queste piante sono state utilizzate per eseguire osservazioni e misure approfondite: con cadenza bisettimanale, su ciascuna foglia è stata osservata l'intensità del danno fogliare da ozono (capitolo 2.2.3.1), misurati il contenuto di clorofilla (capitolo 2.2.3.2) e la fluorescenza diretta della clorofilla *a* (capitolo 2.2.3.3).

Tutti i rilievi e le misure sono stati eseguiti nel periodo maggio - settembre 2009.

Tabella 2.1. Siti, repliche e numero di piante monitorate. Con l'asterisco sono indicate le due Repliche dove sono state effettuate osservazioni specifiche sull'intensità dei sintomi e misure fisiologiche su sei piante individuate casualmente tra tutte quelle selezionate per lo studio.

Nome del sito 1x1 km	N. totale di aree aperte nel quadrato 1x1 km	N. di aree aperte idonee (con N. piante ≥ 10)	N. di aree aperte selezionate (= Repliche)	Codice dell'area aperta	Long. E	Lat. N	Quota m s.l.m.	N. totale di piante per area aperta	N. di piante selezionate
Lasino	13	6	3	L1	1653069	5098585	483	11	10
				L6*	1653924	5098140	517	30	10
				L18	1653801	5098767	491	10	10
Margone	11	9	3	M3	1652173	5103667	919	77	16
				M7	1652100	5103869	967	32	10
				M8*	1652124	5103913	973	59	12

2.2.2 Misura dei parametri ambientali nel periodo di studio

I rilievi in campo sono stati svolti dal 6 maggio al 30 settembre 2009. In ciascuna delle 6 repliche sono stati settimanalmente rilevati i parametri meteorologici e le concentrazioni di ozono. Le osservazioni sulle piante per il rilievo della presenza di sintomi fogliari ozono-specifici sono invece state effettuate con cadenza bisettimanale.

2.2.2.1 Concentrazioni di ozono e stime di esposizione

Le concentrazioni di ozono sono state misurate su base settimanale per un periodo di 22 settimane. Le misure sono state effettuate utilizzando campionatori passivi *Passam ag* (Männedorf, Svizzera - <http://www.passam.ch/ozone.htm>); in ciascuna delle sei aree aperte (repliche) ogni settimana venivano simultaneamente esposti due campionatori, collocati all'interno dello stesso espositore, per limitare la possibilità di perdita accidentale di dati.

I campionatori passivi per la misura dell'ozono sono costituiti da fiale in polipropilene con un filtro in fibra di vetro imbevuto con soluzione di acido acetico e 1,2-di(4-piridil)-etilene, che reagisce con l'ozono entrato nel campionatore per diffusione. La reazione comporta la formazione di un'aldeide, la cui determinazione quantitativa mediante spettrofotometria (a 442 nm) consente di risalire alla concentrazione media oraria settimanale di ozono.

L'AOT40 è stato stimato secondo il metodo proposto da Gerosa *et al.* (2007).

2.2.2.2 Dati meteorologici

Ogni replica è stata equipaggiata con un sensore per la temperatura dell'aria (T) e dell'umidità relativa (U.R.) (Tinytag Ultra, Gemini Data Loggers Ltd., Chichester, UK). I *data loggers*, programmati per registrare un dato per parametro ogni 15 minuti per tutto il periodo di studio, sono stati installati in prossimità dei margini boschivi in condizioni analoghe a quelle delle piante di *V. lantana*, ad un'altezza approssimativa di 1,5 m. Valori medi settimanali di temperatura ed umidità relativa sono stati calcolati a partire dai dati grezzi acquisiti ed utilizzati per le analisi statistiche.

2.2.3 Rilievo degli indicatori di risposta

2.2.3.1 Sintomi fogliari

Il rilievo dei sintomi fogliari è stato effettuato ogni due settimane, dal 6 maggio al 15 settembre. A ogni rilievo, ciascuna pianta selezionata è stata classificata come sintomatica o non in base alla presenza o assenza di sintomi fogliari. Inoltre a ciascuna delle 5 foglie individuate sulle 6 + 6 piante - oggetto di studio approfondito - è stata attribuita la percentuale di superficie fogliare interessata dalla presenza di sintomi fogliari, espressa in classi del 5%.

A tale scopo ogni pianta è stata attentamente osservata per l'individuazione della presenza di sintomi fogliari attribuibili all'ozono, esaminando le foglie con una lente d'ingrandimento 10x. Sono stati identificati come tipici sintomi fogliari attribuibili all'ozono le punteggiature (stipples) bruno-scure, internervali, presenti sulla superficie adassiale (superiore) della foglia, secondo quanto definito nel protocollo del *Working Group on Air Quality* (UN/ECE, 2004) e riferendosi alla guida fotografica di Innes *et al.* (2001). I rilevatori avevano precedentemente

effettuato specifici addestramenti attraverso la partecipazione ai corsi “*UNECE/ICP-Forests Intercalibration Course on the Assessment of Ozone Visible Injury*” (2007, 2008 e 2009). I rilievi in campo sono stati validati mediante osservazioni microscopiche seguendo la metodica indicata da vari Autori (Vollenweider *et al.*, 2003; Gunthardt-Goerg & Vollenweider, 2007). La tipica presenza di cellule del tessuto a palizzata collassate a causa del danno subito dall’ozono è stata verificata realizzando delle sezioni sottili di foglia (50 μm) utilizzando un microtomo a lama vibrante (Vibratome® Series 1500, *St Louis, MO, USA*) ed effettuando osservazioni al microscopio ottico ad ingrandimento 400X (Leitz Diaplan optical microscope, Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany).

2.2.3.2 Contenuto di clorofilla (SPAD)

Il contenuto di clorofilla nelle foglie è stato misurato *in vivo* utilizzando il clorofillometro portatile SPAD-502DL Plus, Minolta (Spectrum Technologies Ltd, Plainfield, IL, USA). Lo strumento si basa sulla caratteristica della clorofilla di avere due picchi di assorbanza, nella regione del blu (400-500 nm) e del rosso (600-700 nm) e di non avere alcuna assorbanza nella regione dell’infrarosso. Lo SPAD misura l’assorbanza della foglia nelle regioni del rosso e dell’infrarosso; usando queste due assorbanze, lo strumento calcola un valore numerico SPAD che è proporzionale alla quantità di clorofilla presente nella foglia; per questo motivo i dati sono riportati come unità arbitrarie.

Per ogni foglia sono state acquisite 5 misure e quindi è stato calcolato il valore medio.

2.2.3.3 Fluorescenza diretta della clorofilla *a*

L’energia luminosa assorbita dalle molecole dei pigmenti fotosintetici può avere tre destini: una parte viene trasferita verso i centri di reazione dei fotosistemi (PSII e PSI) e utilizzata nei processi fotochimici; una parte di questa energia non raggiunge i centri di reazione ed è dissipata sotto forma di calore; un’altra parte viene riemessa sotto forma di fluorescenza, che rappresenta un’altra forma di dissipazione dell’energia. La quantità di energia dissipata come fluorescenza durante la fotosintesi è piccola e varia dal 3% al 5%; un incremento dell’emissione di fluorescenza indica una riduzione dell’efficienza della fotosintesi (Lichtenthaler & Rinderle, 1988). Tramite l’analisi della fluorescenza della clorofilla è pertanto possibile ottenere informazioni sull’efficienza degli apparati fotosintetici, e quindi valutare lo stato fisiologico di campioni fotosintetici.

La misura della fluorescenza diretta della clorofilla *a* viene eseguita dopo pre-adattamento al buio (20-30 minuti) del campione fotosintetico. Quindi, il campione viene illuminato con luce continua di lunghezza d’onda inferiore a 670 nm. Un foto-rilevatore registra l’intensità della fluorescenza della clorofilla che passa dallo stato minimo F_0 (quando tutti i centri di reazione del PSII sono aperti, cioè quando il chinone accettore primario Q_A è completamente

ossidato) allo stato massimo F_M (quando l'intensità di eccitazione è sufficientemente elevata da assicurare la riduzione e dunque la chiusura di tutti i centri di reazione del PSII); dopo aver raggiunto F_M , in presenza di condizioni di luce saturante, il segnale di fluorescenza decresce e in alcuni minuti raggiunge un livello stabile (F_S). Questo andamento nell'emissione della fluorescenza è noto come "effetto Kautsky". La prima parte della curva di induzione di fluorescenza (da F_0 a F_M) è detta "transiente di fluorescenza" (*fluorescence transient*, FT) (Strasser *et al.*, 2004; Strasser *et al.*, 2010) e rappresenta la "cinetica veloce".

Il *transient* di fluorescenza viene registrato per 1 s a partire da 10 μ s dopo l'inizio dell'illuminazione (ogni 10 μ s tra 0 e 0,3 ms; 100 μ s tra 0,3 e 3 ms; 1 ms tra 3 e 30 ms; 10 ms tra 30 e 300 ms; 100 ms tra 300 e 1.000 ms). Rappresentato graficamente su una scala temporale logaritmica, il *transient* di fluorescenza mostra un andamento polifasico (Strasser & Govindjee, 1992; Strasser *et al.*, 1995); l'analisi del *transient* - chiamato JIP-test - prende in considerazione i valori di fluorescenza a 50 μ s (F_0 , step O), 100 μ s, 300 μ s, 2ms (step J), 30 ms (step I) e la fluorescenza massima (F_M , step P) (Figura 2.3; Tabella 2.2).

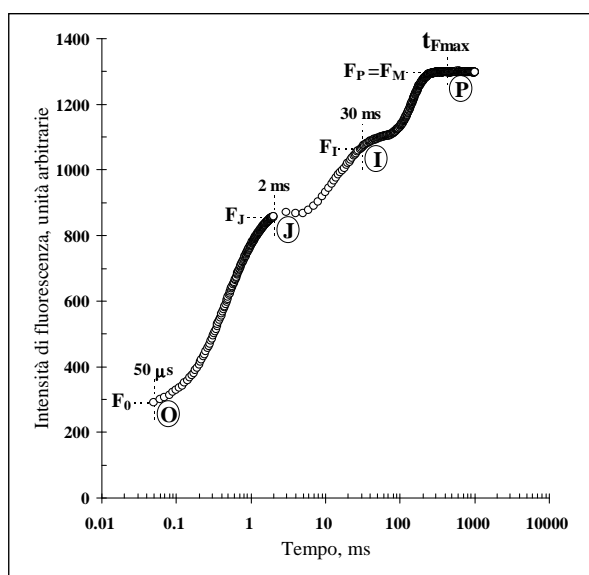


Figura 2.3. Tipico andamento polifasico del transiente di fluorescenza della clorofilla *a* di piante superiori. Il transiente è rappresentato su scala logaritmica temporale da 50 μ s a 1 s. I segnali sono le intensità di fluorescenza: F_0 (a 50 μ s); F_J (a 2 ms); F_I (a 30 ms); $F_P = F_M$ (intensità di fluorescenza massima al tempo t_{Fmax}).

Le tre fasi di aumento della fluorescenza OJIP (O-J, J-I e I-P) rappresentano tre differenti processi di riduzione nella catena di trasporto degli elettroni (Schansker *et al.*, 2005). La fase O-J, detta fotochimica, riflette gli eventi che iniziano con la dissociazione delle molecole di acqua per opera dell'*Oxygen Evolving Complex* (OEC) fino al trasferimento di elettroni nella catena di trasporto tra il PSII e il PSI, cioè il primo ciclo di riduzione del plastochinone Q_A

(Strasser *et al.*, 2004). In questa fase, a circa 300 μ s, può evidenziarsi una banda (banda K) come conseguenza di diversi fattori di stress, indicando una ridotta efficienza del donatore di elettroni dell'*Oxygen Evolving System*. Le fasi J-I-P rappresentano la fase termica del *transient* e riflettono le reazioni multiple di ossidoriduzione, ovvero l'efficienza del trasporto degli elettroni oltre il PSI, cioè la riduzione degli accettori finali quali la ferridossina e il NADP, che alimentano direttamente il Ciclo di Calvin nella fase oscura della fotosintesi (riduzione della CO_2).

Nel presente lavoro sono stati presi in esame sei parametri analitici del OJIP-test [per una rassegna completa si rimanda a Strasser *et al.* (2000)].

I valori dei punti estremi del transiente (F_0 e F_M) consentono di calcolare la resa quantica massima delle reazioni fotochimiche primarie; essa esprime la massima probabilità di catturare l'energia dei fotoni assorbiti dall'antenna da parte dei centri di reazione del PSII ed è espressa dalla formula:

$$\phi_{Po} = [F_M - F_0] / F_M = F_V / F_M$$

dove F_V esprime la fluorescenza variabile massima ($F_V = F_M - F_0$).

I processi fisiologici legati ai punti intermedi possono essere evidenziati comparando le traiettorie normalizzate delle curve del transiente di fluorescenza. I relativi parametri del JIP-test sono:

- la fluorescenza relativa variabile a 100 μ s, espressa dalla formula:

$$W_{(OK)}100 = (F_{100\mu s} - F_0) / (F_{300\mu s} - F_0)$$

- la fluorescenza relativa variabile a 300 μ s, espressa dalla formula:

$$W_{(OJ)}300 = (F_{300\mu s} - F_0) / (F_{(2ms)} - F_0)$$

- la probabilità che un elettrone catturato dal centro di reazione del PSII entri nella catena di trasporto degli elettroni e sia trasferito oltre il Q_A^- , espressa dalla formula:

$$\Psi_0 = 1 - V_J = (F_{J(2ms)} - F_0) / (F_M - F_0)$$

dove V_J indica la fluorescenza variabile relativa a 2ms (transiente normalizzato tra F_0 e F_M);

- eventi fotochimici attorno al PSI espressi con il parametro ΔV_{I-P} , che indica l'ampiezza della fase I-P, espressa dalla formula:

$$1 - V_I = (F_M - F_{I(30ms)}) / (F_M - F_0) = \Delta V_{I-P}$$

dove V_I indica la fluorescenza variabile relativa a 30ms (transiente normalizzato tra F_0 e F_M ; $V_I = (F_{30ms} - F_0) / (F_M - F_0)$).

Infine, gli indici di performance (Performance Index; PI) sono espressioni multiparametriche elaborate attraverso i vari step sopra menzionati, ciascuno contribuendo alla fotosintesi. PI_{TOT} è il performance index che descrive la capacità di assorbimento della radiazione solare del fotosistema PSII (*trapping capacity*), l'efficienza del trasporto elettronico e il flusso elettronico oltre il PSI [per ulteriori dettagli e formule si veda Strasser *et al.* (2010)].

Il JIP-test presenta alcuni importanti vantaggi quali la rapidità nell'acquisizione dei dati e l'approccio non distruttivo, indispensabile per studi in cui è necessario ripetere le misure in tempi diversi sugli stessi campioni.

Per questo studio le misure della fluorescenza diretta della clorofilla *a* sono state effettuate utilizzando un fluorimetro Handy-PEA (Hansatech Instruments, Pentney, Norfolk, UK); le foglie sono state adattate al buio per 30 minuti utilizzando *leafclips*. La maggior parte delle misure è stata acquisita tra le 8.30 e le 12.00 per evitare le ore più calde; solo in un caso (1 luglio 2009, DOY 182) sono state acquisite più tardi (h 12.00 - 14.30). Le misure sono sempre state effettuate prima nel sito a basso ozono e immediatamente dopo nel sito ad alto ozono.

Tabella 2.2. Parametri di fluorescenza ottenuti dall'analisi del transiente (JIP-test).

		Indica:
$F_0 = F_{50\mu s}$	Fluorescenza a 50 μs	la fluorescenza basale
$F_L = F_2 = F_{100\mu s}$	Fluorescenza a 100 μs	lo stato della connettività del sistema tripartito LHCII – Antenna – RC
$F_K = F_3 = F_{300\mu s}$	Fluorescenza a 300 μs	lo stato di attivazione dell' <i>Oxygen Evolving System</i>
$F_J = F_4 = F_{2ms}$	Fluorescenza a 2 ms	la riduzione del Q_A
$F_I = F_5 = F_{30ms}$	Fluorescenza a 30 ms	la riduzione del pool dei plastochinoni – Q_A e Q_B
$F_P = F_M$	Fluorescenza massima	
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescenza variabile	
$V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescenza variabile relativa al punto J (2 ms)	
$V_I = (F_I - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescenza variabile relativa al punto I (30 ms)	
$W_{(OK)}100 = (F_L - F_0)/(F_K - F_0)$	Fluorescenza relativa variabile a 100 μs , nella fase $F_0 - F_J$	la banda L; riflette cambiamenti nel trasferimento dell'energia di eccitazione fra le unità del PSII
$W_{(OJ)}300 = (F_K - F_0)/(F_I - F_0)$	Fluorescenza relativa variabile a 300 μs , nella fase $F_0 - F_I$	la banda K; indica l'inattivazione dell' <i>Oxygen Evolving Complex</i>
$\Delta V_{I-P} = (F_M - F_I)/(F_M - F_0) = (1 - V_I)$	Ampiezza della fase I-P	la diminuzione della capacità dell'accettore finale di elettroni di essere ridotto
$\psi_0 = ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$		la probabilità che un elettrone catturato dal centro di reazione sia trasferito oltre il Q_A^-
$\phi_{P0} = [1 - (F_0/F_M)] = F_V/F_M$	Resa quantica massima delle reazioni fotochimiche primarie	la capacità del PSII di trattenere l'energia assorbita dalla radiazione solare all'interno dei centri di reazione del PSII
$PI_{TOT} = [1 - (F_0/F_M)]/[M_0/V_J] \cdot [(F_M - F_0)/F_0] \cdot [(1 - V_J)/V_J] \cdot [(1 - V_I)/(1 - V_J)] = Performance Index$		la capacità complessiva di cattura e conservazione dell'energia, dai fotoni assorbiti dal PSII alla riduzione degli accettori finali del PSI

2.2.4 Analisi dei dati

I parametri ambientali, la frequenza e la proporzione delle piante sintomatiche, il contenuto di clorofilla e i parametri di fluorescenza sono stati calcolati per ogni data, replica e sito. I limiti di confidenza per le percentuali di piante sintomatiche sono stati calcolati secondo Zar (1999).

I singoli valori di fluorescenza registrati in ogni data ai tempi 50 μ s, 100 μ s, 300 μ s, 2 ms, 30 ms e la fluorescenza massima F_M sono stati analizzati per valutare la variabilità tra foglie della stessa pianta e tra piante. A tal fine è stato applicato il coefficiente di variazione (CV):

$$CV = \sigma/\mu$$

dove σ è la deviazione standard e μ è la media dei valori considerati.

La correlazione per ranghi Spearman è stata utilizzata per verificare eventuali relazioni tra le variabili ambientali e tra queste e gli indicatori di risposta (percentuale di piante sintomatiche; contenuto di clorofilla SPAD; parametri del JIP-test).

Per le rappresentazioni grafiche, i parametri rilevati sono stati relativizzati secondo la formula:

$$(\text{sito ad alto ozono} / \text{sito a basso ozono}) - 1$$

Tutte le analisi statistiche sono state elaborate con il programma Statistica 7.1 (Statsoft 2006, Tulsa, OK, USA).

2.3 Risultati

2.3.1 Parametri ambientali nel periodo di studio

In Tabella 2.3 sono riportati i valori medi di temperatura, umidità relativa, ozono e AOT40 rilevati nel periodo 6 maggio – 30 Settembre 2009. Concentrazioni di ozono, AOT40 e U.R. sono più bassi alle quote inferiori, mentre la T è più elevata. Questo pattern spaziale di aumento delle concentrazioni di ozono con l'aumentare della quota (e quindi con il diminuire della T) è un comportamento già verificato in precedenti studi in Trentino (Cristofolini *et al.*, 2011). La Figura 2.4 riporta la variazione temporale giornaliera di T, U.R. e ozono (concentrazione ed esposizione) nel periodo di studio in entrambi i siti.

Tabella 2.3. Variabili ambientali (T e U.R.), concentrazioni medie di ozono ed esposizione finale (AOT40) nel periodo 6.05.09 - 30.09.09 nei due siti di studio.

Repliche	T media °C	U.R. %	Media O ₃ μg m ⁻³ h ⁻¹	AOT40 ppb h
L1	20,2	71,1	95,4 ± 14,76	27880
L6	19,3	70,4	88,6 ± 12,43	21523
L18	19,9	72,8	89,8 ± 14,05	23358
<i>Media Lasino</i>	<i>19,8</i>	<i>71,4</i>	<i>91,3 ± 13,74</i>	<i>24254</i>
M3	17,7	76,4	106,4 ± 17,86	30687
M7	16,2	78,3	108,0 ± 17,37	32081
M8	16,2	77,7	111,1 ± 17,06	35001
<i>Media Margone</i>	<i>16,7</i>	<i>77,4</i>	<i>108,5 ± 17,43</i>	<i>32589</i>

Valori più dettagliati di temperatura registrati dai dataloggers (quattro dati all'ora) sono rappresentati in Figura 2.5: è da notare che le temperature hanno raggiunto valori > 30 °C a Lasino ma non a Margone. Le correlazioni tra le serie temporali delle variabili ambientali sono riportate in Tabella 2.4. La concentrazione di ozono e l'esposizione (AOT40) mostrano una co-variazione positiva con la temperatura mentre non sono state evidenziate correlazioni positive con l'umidità relativa. Ciò costituisce una conferma che i livelli di ozono in Trentino dipendono spazialmente dalla quota e temporalmente dalla temperatura. I valori di AOT40 sono rappresentati in Figura 2.4d: si nota che i livelli critici UN/ECE per la vegetazione semi-naturale (5.000 ppb h) e i valori target e a lungo termine dell'EU (9.000 and 3.000 ppb h rispettivamente) per la protezione della vegetazione sono stati raggiunti tra l'inizio di giugno (3.000 ppb h, entrambi i siti) e l'inizio di luglio (9.000 ppb h, entrambi i siti).

Le concentrazioni di ozono (Fig. 2.4c) misurate nei due siti hanno andamenti temporali coerenti tra loro, ma a Margone – sito selezionato come ad “alto ozono” – sono sempre superiori rispetto a Lasino – sito selezionato come a “basso ozono” –, confermando la correttezza della selezione delle aree di studio.

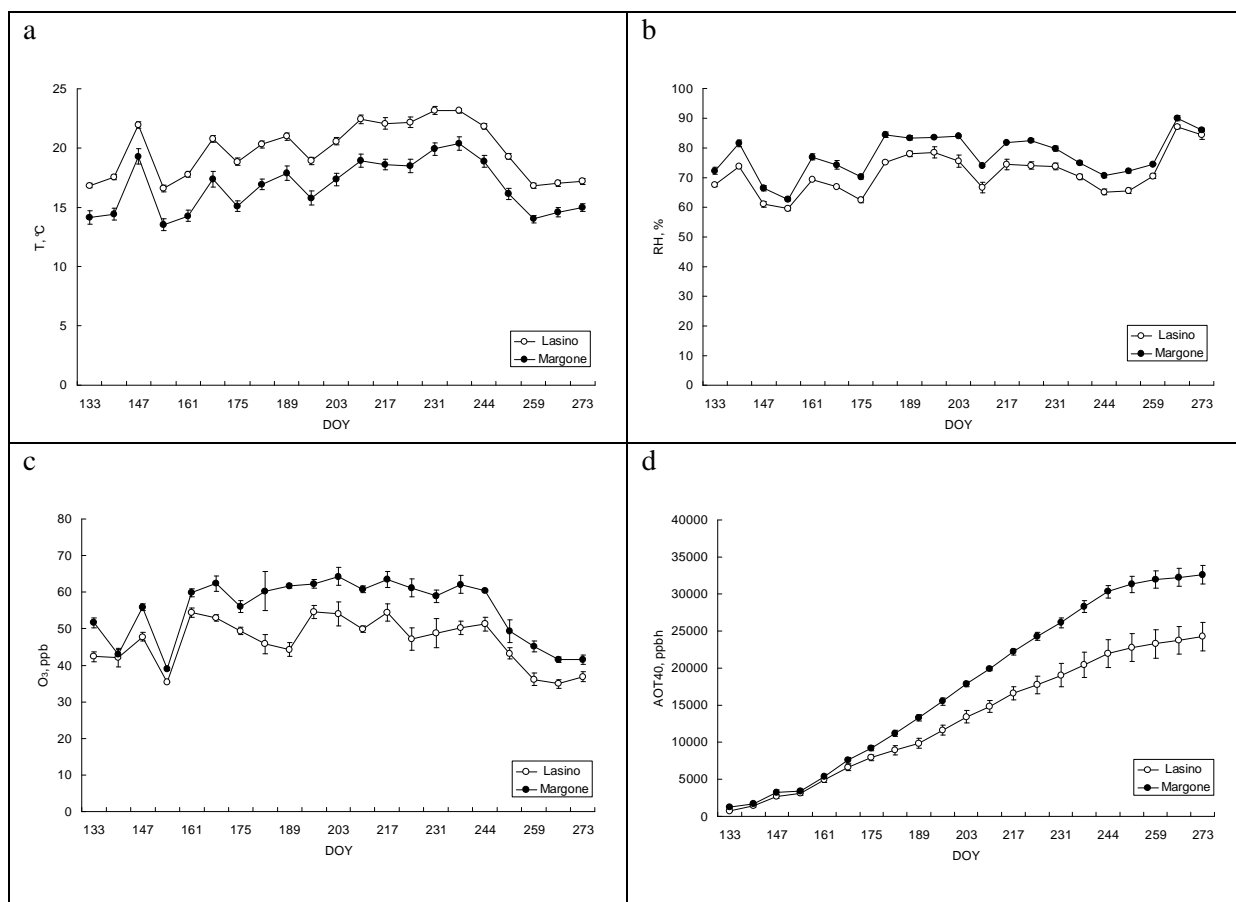


Figura 2.4. Variazione temporale di temperatura (a), umidità relativa (b), concentrazioni di ozono (c) ed esposizione all'ozono (d) registrati dal 6 maggio (DOY, Day Of Year=133) e il 30 settembre 2009 (DOY=273) nei due siti di studio. Le barre rappresentano l'errore standard.

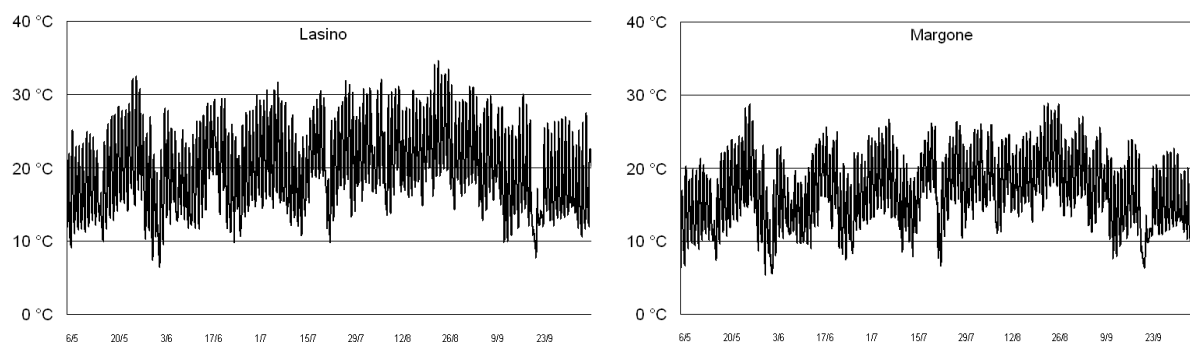


Figura 2.5. Temperature (un dato ogni 15 minuti) registrate nei due siti di studio nel 2009 (medie dei valori registrati nelle tre aree aperte di ciascun sito).

Tabella 2.4. Correlazioni per ranghi di Spearman tra le serie temporali dei parametri ambientali (correlazioni significative in grassetto per $p < 0,05$).

	L1 (n=21)	L6 (n=21)	L18 (n=21)	M3 (n=21)	M7 (n=21)	M8 (n=21)
T-RH	-0.10	-0.15	0,04	-0.04	-0.06	0.06
T-O ₃	0,62	0,56	0,52	0,66	0,49	0,67
T-AOT40	0,66	0,57	0,51	0,66	0,49	0,67
RH-O ₃	0,02	-0,18	-0,06	0,12	0,20	0,11
RH-AOT40	0,00	-0,16	-0,08	0,11	0,20	0,11
O ₃ -AOT40	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00

2.3.2 Sintomi fogliari

I sintomi fogliari osservati in campo sono risultati corrispondenti a quelli riportati in letteratura come indotti dall'ozono: le piante sintomatiche hanno infatti manifestato le tipiche punteggiature internervali (stipple) sulla faccia superiore della lamina fogliare, con diffusione iniziale prevalentemente sulle foglie più vecchie (Figura 2.6).



Figure 2.6. Sintomi da ozono rilevati in campo su piante spontanee di *V. lantana*.

Ulteriori conferme della corretta diagnosi dei sintomi sono state ottenute attraverso osservazioni microscopiche effettuate su sezioni di foglie (Figura 2.7). Oltre ai tipici danni da

ozono (stipple), a Margone è stata frequentemente osservata anche la presenza di una pigmentazione dovuta all'accumulo di antociani (Figura 2.8). L'accumulo di antociani è considerato come una risposta aspecifica di *V. lantana* per proteggere i cloroplasti da un eccesso di eccitazione attraverso l'attivazione di un processo di dissipazione dell'energia controllato (Gravano *et al.*, 2004).

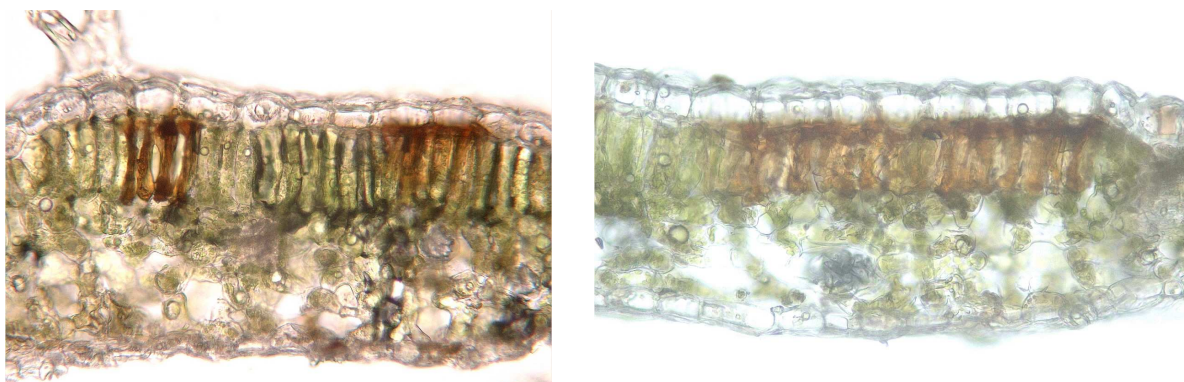


Figura 2.7. Sezioni di lamina fogliare di *V. lantana* al microscopio ottico; si notano i gruppi di cellule del tessuto a palizzata collassate a causa del danno subito dall'ozono.

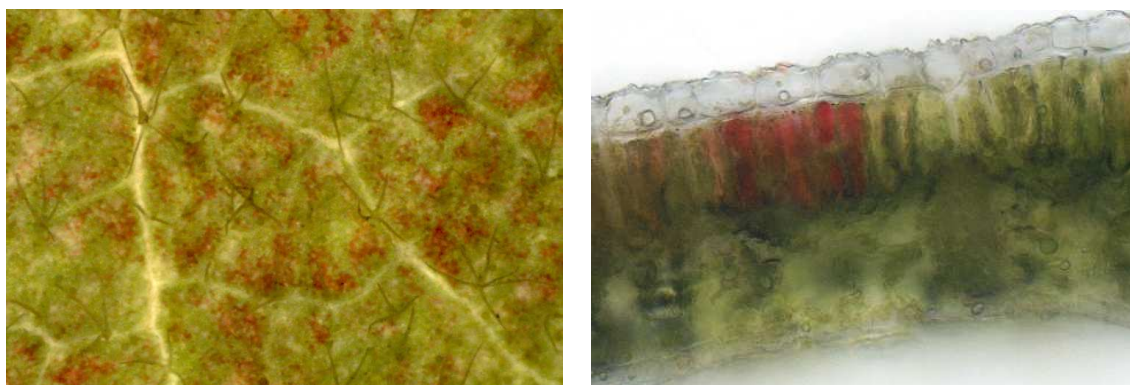


Figura 2.8. Arrossamenti sulla faccia adassiale della lamina fogliare di *V. lantana* (sinistra) e corrispondente accumulo di antociani nel tessuto a palizzata (destra).

La Figura 2.9 riporta lo sviluppo temporale della frequenza di piante sintomatiche nelle sei repliche. I sintomi sono comparsi più precocemente e si sono sviluppati in maniera più rapida a Margone che a Lasino: nel primo sito - ad alto ozono - i sintomi sono stati individuati per la prima volta all'inizio di luglio, mentre nel sito a basso ozono i sintomi sono comparsi solo all'inizio di agosto. L'incremento maggiore della percentuale di piante sintomatiche si è

verificato tra metà luglio e metà agosto in entrambi i siti, con una tempistica analoga a quella riportata da Bussotti *et al.* (2005). A metà settembre (DOY 259), la frequenza delle piante sintomatiche era 0,71 (intervallo di confidenza al 95%: 0,545 - 0,790) a Margone e 0,17 (intervallo di confidenza al 95%: 0,059 - 0,502) a Lasino. Nella seconda metà di settembre non è stato più possibile identificare chiaramente i sintomi indotti dall'ozono a causa della senescenza fogliare.

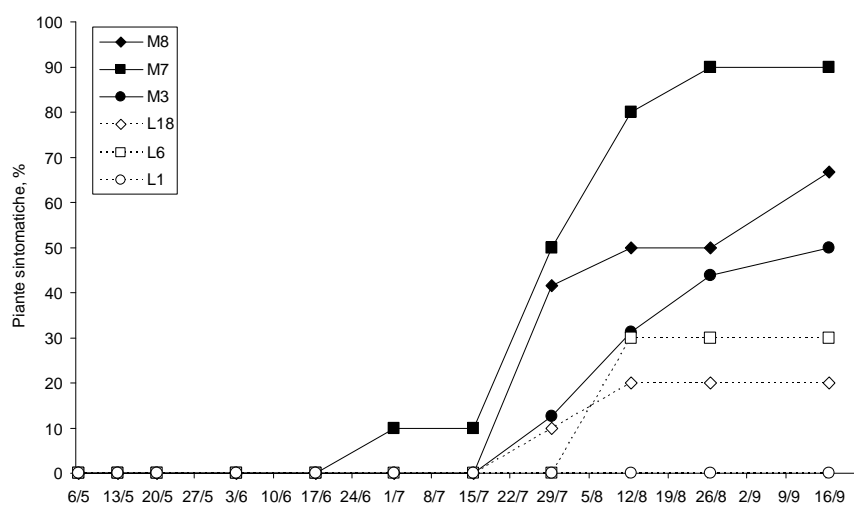


Figura 2.9. Sviluppo temporale della percentuale di piante sintomatiche nelle sei repliche. I simboli pieni rappresentano le tre aree aperte ad alto ozono (Margone); i simboli vuoti rappresentano le tre aree aperte a basso ozono (Lasino).

2.3.3 Contenuto di clorofilla e fluorescenza diretta della clorofilla a

2.3.3.1 Aspetti metodologici

In Figura 2.10 sono riportati i coefficienti di variazione calcolati tra i valori di fluorescenza rilevati sulle 5 foglie di ciascuna pianta, ad ogni data e nei due siti. In Figura 2.11 sono riportati i coefficienti di variazione calcolati tra i valori di fluorescenza media delle 6 piante per ciascun sito. La variabilità dei dati tra le foglie di ciascuna pianta è mediamente più elevata di quella tra le piante e tende ad aumentare con il tempo; nella prima parte del periodo di studio la variabilità dei dati di fluorescenza è per lo più inferiore al 20%, nelle ultime settimane di misure la variabilità raggiunge in alcuni casi anche il 30%. I valori più elevati di CV agli step J e P al DOY 182 per il sito con basso ozono potrebbero essere imputabili al diverso orario in cui sono state effettuate le misure rispetto alle altre date (tra le ore 12.00 - 13.00 anziché tra le 8.30 - 9.30). A conferma di tale ipotesi, in Figura 2.12 sono rappresentati

i valori di fluorescenza massima (F_M) in funzione dell'ora di acquisizione; si nota che il range di valori di F_M è più ampio in prossimità delle ore centrali della giornata, con un picco massimo verso le ore 12.30.

La variabilità tra i dati riferiti alle singole piante è nella maggior parte dei casi inferiore al 10%, comunque sempre inferiore al 20%, e piuttosto costante nel tempo. Si nota una variabilità maggiore tra i valori di fluorescenza misurati a 30 ms e di fluorescenza massima (F_M) sulle piante del sito ad alto ozono nella seconda metà del periodo di studio (a partire dal DOY 196).

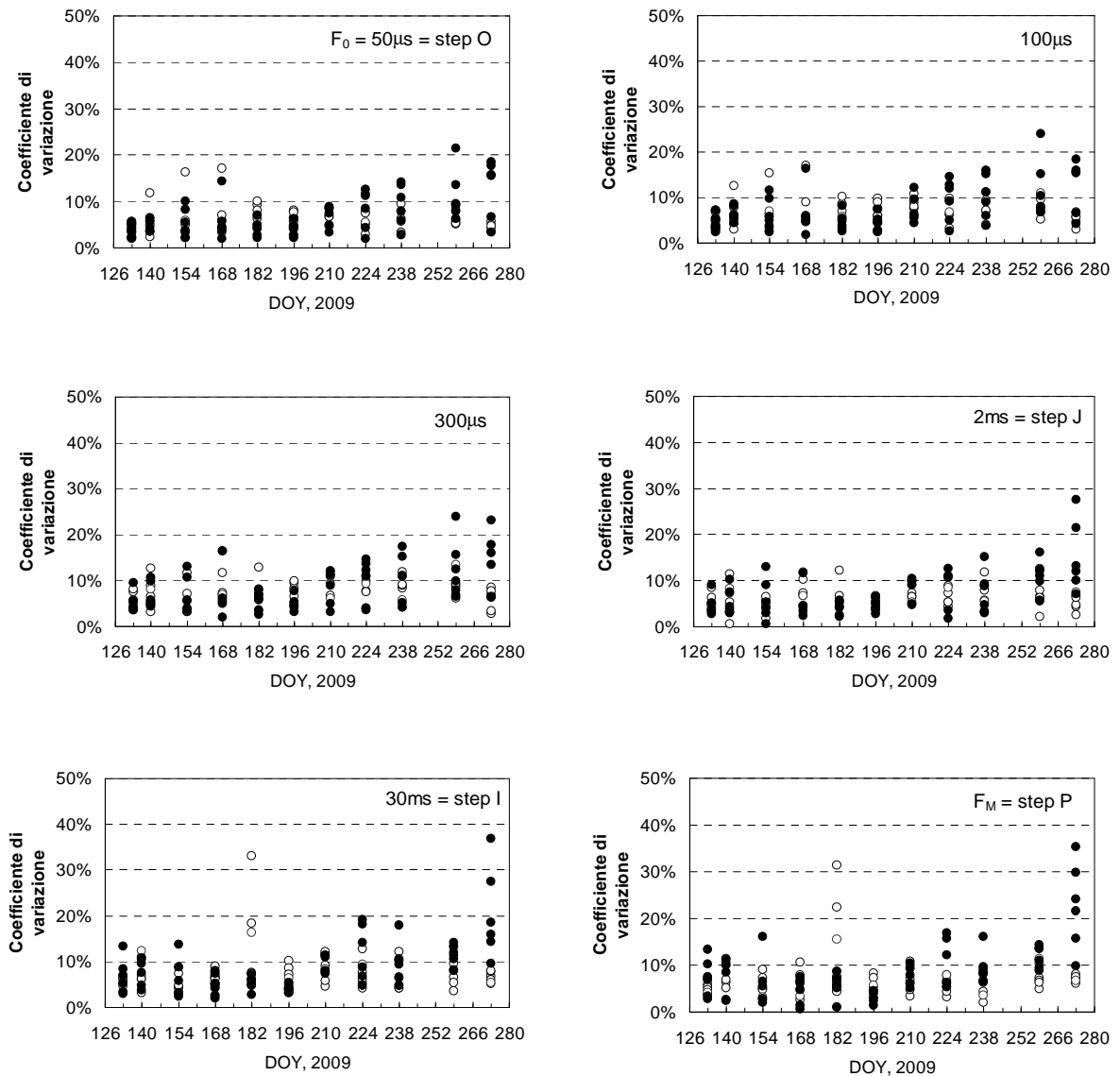


Fig. 2.10. Coefficienti di variazione tra foglie, per pianta e data, dei valori di transiente di fluorescenza registrati nei principali tempi; i simboli vuoti e pieni si riferiscono rispettivamente alla situazione a basso ed alto ozono.

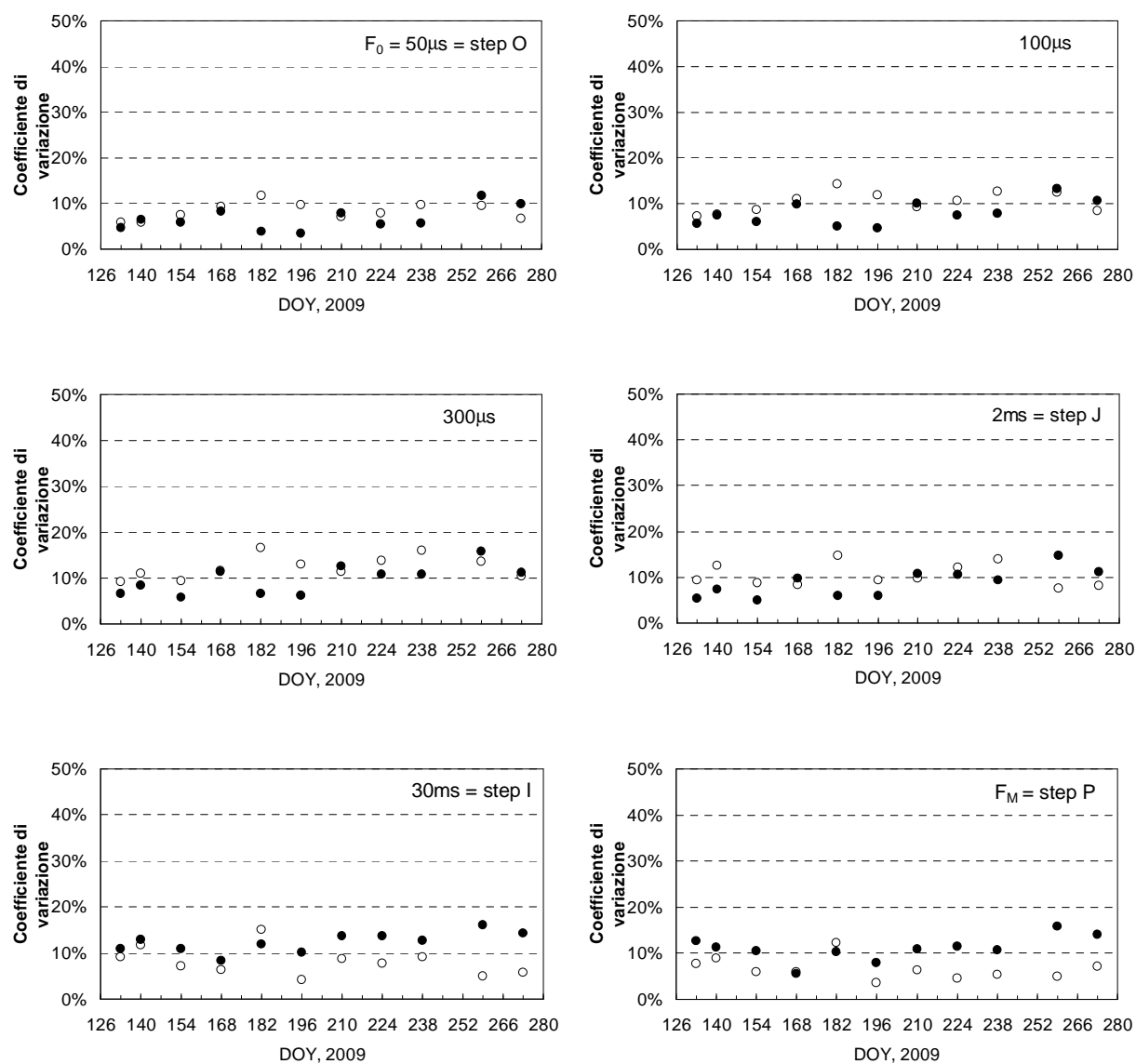


Fig. 2.11. Coefficienti di variazione tra piante dei valori di transiente di fluorescenza registrati nei principali tempi; i simboli vuoti e pieni si riferiscono rispettivamente alla situazione a basso ed alto ozono.

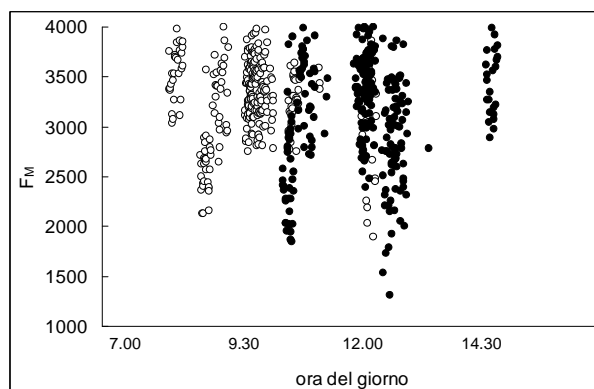


Fig. 2.12. Valori di fluorescenza massima registrati nei due siti di studio (simbolo vuoto = basso ozono; simbolo pieno = alto ozono) in relazione all'ora di acquisizione dei dati.

2.3.3.2 Andamento temporale del contenuto di clorofilla e della fluorescenza diretta della clorofilla a

In Figura 2.13a è riportato l'andamento temporale dei valori medi (\pm deviazione standard) del contenuto fogliare di clorofilla misurato con il clorofillometro SPAD sulle piante di *V. lantana* a Lasino e Margone. Si nota che nella seconda parte del periodo di studio il contenuto di clorofilla a Margone (alto ozono) tende a diminuire mentre a Lasino resta piuttosto costante. Questo comportamento è messo in evidenza dalla rappresentazione grafica dei dati relativizzati (Figura 2.13b) da cui risulta ben chiara la variazione relativa del contenuto di clorofilla a partire dalla seconda metà di luglio.

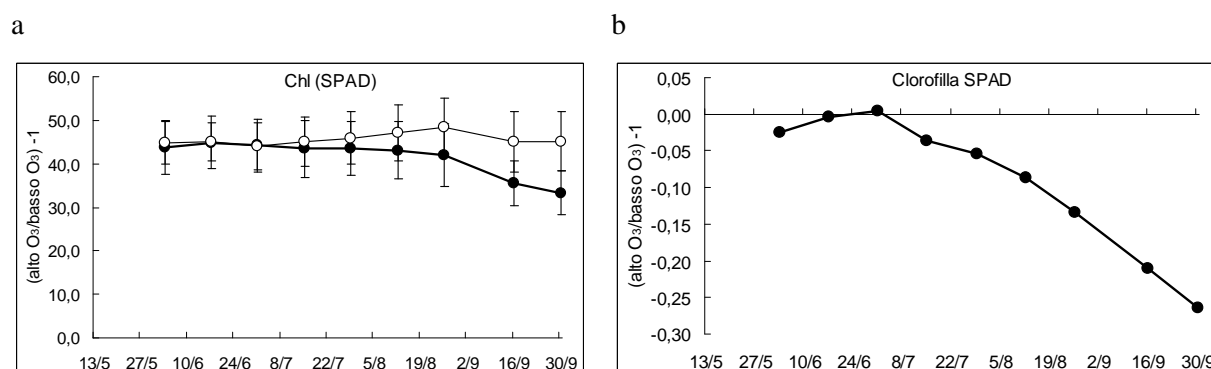


Figura 2.13. Andamento temporale dei valori medi (\pm deviazione standard) del contenuto fogliare di clorofilla misurato con il clorofillometro SPAD sulle piante di *V. lantana* a Lasino (= basso ozono, simbolo vuoto) e Margone (= alto ozono, simbolo pieno) (a); valori di clorofilla relativizzati [(Margone / Lasino) - 1] (b).

L'efficienza fotosintetica delle piante è stata valutata mediante l'analisi della fluorescenza della clorofilla *a*. I valori medi (\pm deviazione standard) dei principali parametri di fluorescenza che descrivono la curva OJIP per i siti a basso ed alto ozono nelle diverse settimane di studio sono riportati in Tabella 2.5.

Tabella 2.5. Valori medi (\pm deviazione standard) dei principali parametri del JIP-test ottenuti dai transienti di fluorescenza registrati con il fluorimetro HandyPEA nei siti a basso ed alto ozono alle diverse date del periodo di studio.

	Data	DOY	Lasino, basso ozono			Margone, alto ozono		
			media		ds	media		ds
F_0	13/05/2009	133	479,828	\pm	24,17	490,967	\pm	24,14
	27/05/2009	140	631,700	\pm	40,13	654,897	\pm	42,93
	03/06/2009	154	704,567	\pm	74,60	675,633	\pm	52,52
	17/06/2009	168	658,067	\pm	72,49	618,400	\pm	53,82
	01/07/2009	182	687,000	\pm	84,61	631,467	\pm	28,87
	15/07/2009	196	657,733	\pm	54,69	613,533	\pm	29,81
	29/07/2009	210	602,533	\pm	38,91	619,400	\pm	48,49
	12/08/2009	224	601,633	\pm	35,35	623,400	\pm	53,76
	26/08/2009	238	620,267	\pm	48,86	636,767	\pm	56,56
	16/09/2009	259	612,241	\pm	48,46	553,900	\pm	77,09
	30/09/2009	273	603,533	\pm	37,49	761,964	\pm	124,14
F_M	13/05/2009	133	2566,517	\pm	222,44	2342,367	\pm	324,53
	27/05/2009	140	3400,333	\pm	367,62	3415,759	\pm	428,01
	03/06/2009	154	3557,133	\pm	272,64	3518,967	\pm	416,99
	17/06/2009	168	3538,367	\pm	282,46	3720,533	\pm	256,71
	01/07/2009	182	3095,893	\pm	564,39	3583,200	\pm	392,00
	15/07/2009	196	3527,600	\pm	221,44	3564,733	\pm	282,90
	29/07/2009	210	3307,000	\pm	284,82	3345,000	\pm	416,64
	12/08/2009	224	3286,467	\pm	228,45	3205,100	\pm	478,22
	26/08/2009	238	3250,367	\pm	239,51	3169,500	\pm	427,15
	16/09/2009	259	3322,966	\pm	290,93	2929,433	\pm	540,18
	30/09/2009	273	3307,833	\pm	300,52	2610,429	\pm	666,37
Φ_{Po}	13/05/2009	133	0,764	\pm	0,02	0,738	\pm	0,03
	27/05/2009	140	0,767	\pm	0,03	0,758	\pm	0,04
	03/06/2009	154	0,755	\pm	0,04	0,760	\pm	0,04
	17/06/2009	168	0,770	\pm	0,04	0,795	\pm	0,02
	01/07/2009	182	0,722	\pm	0,07	0,782	\pm	0,02
	15/07/2009	196	0,769	\pm	0,03	0,788	\pm	0,02
	29/07/2009	210	0,779	\pm	0,02	0,777	\pm	0,03
	12/08/2009	224	0,778	\pm	0,02	0,765	\pm	0,03
	26/08/2009	238	0,771	\pm	0,03	0,758	\pm	0,03
	16/09/2009	259	0,775	\pm	0,03	0,767	\pm	0,03
	30/09/2009	273	0,775	\pm	0,02	0,641	\pm	0,08
W_{ok100}	13/05/2009	133	0,241	\pm	0,01	0,248	\pm	0,01
	27/05/2009	140	0,242	\pm	0,01	0,236	\pm	0,01
	03/06/2009	154	0,252	\pm	0,02	0,242	\pm	0,01
	17/06/2009	168	0,254	\pm	0,02	0,224	\pm	0,02
	01/07/2009	182	0,270	\pm	0,02	0,232	\pm	0,01
	15/07/2009	196	0,250	\pm	0,02	0,237	\pm	0,01
	29/07/2009	210	0,234	\pm	0,02	0,235	\pm	0,02
	12/08/2009	224	0,233	\pm	0,02	0,241	\pm	0,02
	26/08/2009	238	0,244	\pm	0,02	0,245	\pm	0,02
	16/09/2009	259	0,224	\pm	0,03	0,214	\pm	0,02
	30/09/2009	273	0,233	\pm	0,02	0,283	\pm	0,03

	Data	DOY	Lasino, basso ozono			Margone, alto ozono		
W300	13/05/2009	133	0,487	±	0,02	0,493	±	0,03
	27/05/2009	140	0,496	±	0,03	0,486	±	0,03
	03/06/2009	154	0,487	±	0,04	0,479	±	0,02
	17/06/2009	168	0,483	±	0,04	0,447	±	0,03
	01/07/2009	182	0,518	±	0,05	0,449	±	0,03
	15/07/2009	196	0,488	±	0,04	0,464	±	0,02
	29/07/2009	210	0,442	±	0,04	0,446	±	0,04
	12/08/2009	224	0,439	±	0,04	0,455	±	0,03
	26/08/2009	238	0,449	±	0,05	0,469	±	0,05
	16/09/2009	259	0,412	±	0,06	0,409	±	0,04
	30/09/2009	273	0,434	±	0,04	0,538	±	0,05
Ψ_0	13/05/2009	133	0,457	±	0,05	0,445	±	0,07
	27/05/2009	140	0,502	±	0,08	0,470	±	0,08
	03/06/2009	154	0,497	±	0,06	0,495	±	0,09
	17/06/2009	168	0,534	±	0,08	0,540	±	0,06
	01/07/2009	182	0,516	±	0,10	0,514	±	0,06
	15/07/2009	196	0,518	±	0,07	0,553	±	0,05
	29/07/2009	210	0,531	±	0,07	0,557	±	0,06
	12/08/2009	224	0,522	±	0,08	0,563	±	0,06
	26/08/2009	238	0,551	±	0,09	0,545	±	0,06
	16/09/2009	259	0,464	±	0,06	0,425	±	0,05
	30/09/2009	273	0,480	±	0,06	0,408	±	0,08
ΔV_{I-P}	13/05/2009	133	0,229	±	0,03	0,231	±	0,03
	27/05/2009	140	0,229	±	0,05	0,240	±	0,04
	03/06/2009	154	0,198	±	0,04	0,198	±	0,03
	17/06/2009	168	0,205	±	0,04	0,209	±	0,04
	01/07/2009	182	0,245	±	0,06	0,186	±	0,04
	15/07/2009	196	0,220	±	0,03	0,195	±	0,04
	29/07/2009	210	0,227	±	0,06	0,199	±	0,05
	12/08/2009	224	0,224	±	0,06	0,205	±	0,05
	26/08/2009	238	0,233	±	0,07	0,181	±	0,04
	16/09/2009	259	0,234	±	0,04	0,220	±	0,03
	30/09/2009	273	0,231	±	0,04	0,159	±	0,04
PI_{TOT}	13/05/2009	133	11,237	±	2,86	10,135	±	3,57
	27/05/2009	140	12,029	±	5,15	13,167	±	5,30
	03/06/2009	154	8,887	±	3,80	9,507	±	4,82
	17/06/2009	168	11,586	±	6,10	14,256	±	6,41
	01/07/2009	182	11,801	±	6,15	10,445	±	5,03
	15/07/2009	196	11,777	±	4,78	11,424	±	4,44
	29/07/2009	210	15,374	±	9,30	12,326	±	7,70
	12/08/2009	224	15,095	±	9,39	11,543	±	6,28
	26/08/2009	238	16,640	±	12,34	8,311	±	3,25
	16/09/2009	259	17,111	±	9,69	13,820	±	6,52
	30/09/2009	273	15,832	±	11,14	3,126	±	2,25

In Figura 2.14 gli stessi parametri del JIP-test considerati in Tabella 2.5 sono rappresentati in termini relativi [(alto ozono/basso ozono) - 1]. Dopo un iniziale aumento, dai primi di luglio in poi si osserva una tendenziale diminuzione dei parametri ϕ_{P0} ($= F_V/F_M$) e F_M ; i parametri W_{100} e W_{300} mostrano invece una riduzione fino ai primi di luglio e poi tendono ad aumentare. Il parametro ψ_0 evidenzia un tendenziale incremento fino alla metà di agosto, poi cala rapidamente. ΔV_{I-P} presenta un andamento altalenante ma tendenzialmente in calo. Con la metà di giugno il performance index tende a decrescere.

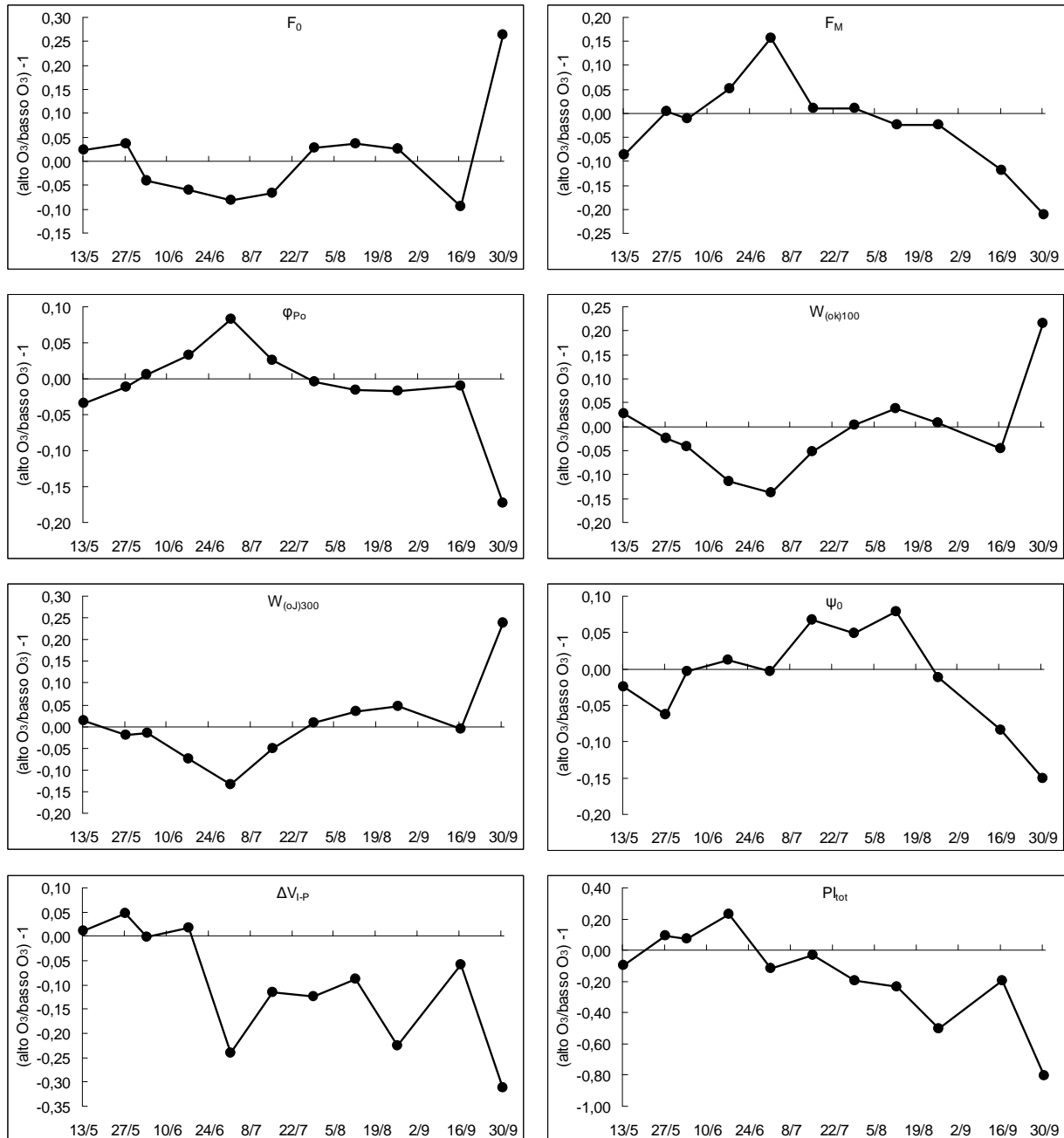


Figura 2.14. Andamento temporale dei parametri del JIP-test relativizzati [(Margone = alto ozono/Lasino = basso ozono) - 1].

2.3.4 Relazioni tra parametri ambientali e risposte morfo-fisiologiche delle piante

Sintomi fogliari e AOT40

La Figura 2.15 riporta lo sviluppo temporale dei sintomi nei due siti in relazione all'andamento dei valori di AOT40. I sintomi iniziano a manifestarsi a differenti livelli di AOT40: circa 13.000 ppb h a Margone e 16.000 ppb h a Lasino; la differenza maggiore riguarda il successivo sviluppo temporale: contrariamente a quanto avviene a Margone, dalla seconda metà di agosto in poi a Lasino i sintomi non aumentano al crescere dei valori di AOT40.

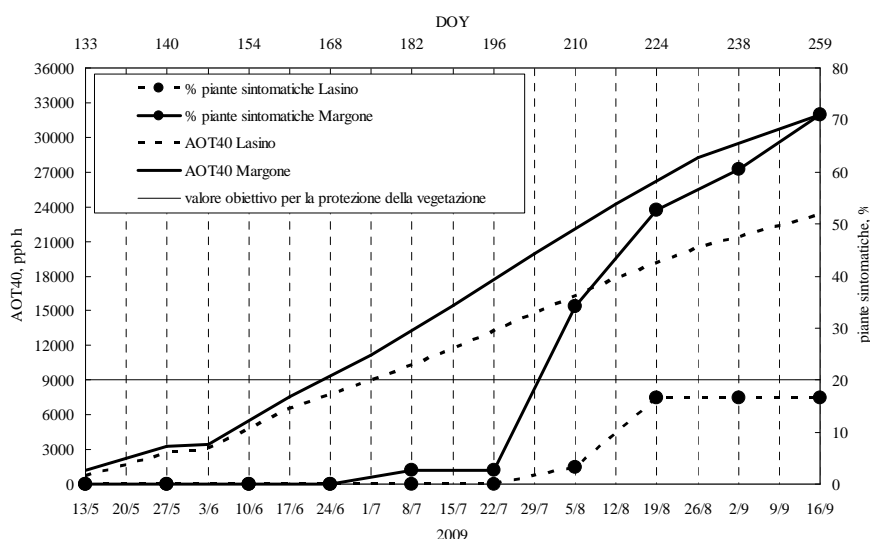


Figura 2.15. Sviluppo temporale della frequenza di piante sintomatiche e dell'AOT40 nei due siti (Lasino e Margone) nel 2009.

Confronti tra differenze cumulate

Data la stretta relazione tra i vari parametri ambientali considerati - in particolare tra ozono (concentrazione ed esposizione) e temperatura (Tabella 2.4) - e la struttura del disegno sperimentale (due quadrati con tre repliche ciascuno; ogni quadrato corrispondente a specifiche condizioni di temperatura, umidità relativa ed ozono), non risulta possibile applicare analisi statistiche formali per isolare il ruolo dei singoli predittori sulle risposte delle piante. Il possibile ruolo delle variabili ambientali nello sviluppo dei sintomi e le relazioni temporali tra le diverse risposte morfologiche e funzionali delle piante sono stati indagati sulla base delle differenze tra i due siti. La Figura 2.16 riporta lo sviluppo temporale delle differenze cumulate tra i dati rilevati nei due siti (Margone - Lasino). In particolare, la Figura 2.16a rappresenta la percentuale delle piante sintomatiche a confronto con i diversi parametri

ambientali misurati (temperatura, umidità relativa, ozono); in Figura 2.16b sono messi a confronto i dati relativi alla percentuale di piante sintomatiche con quelli del contenuto di clorofilla e dell'indice di performance (PI_{TOT}); in Figura 2.16c la percentuale di piante sintomatiche è rappresentata assieme ai valori relativi alla resa quantica massima e alla banda L. Si osserva che le differenze nei sintomi aumentano all'aumentare delle differenze delle concentrazioni di ozono e di umidità relativa e all'aumentare delle differenze di temperatura in negativo (Figura 2.16a). Per quanto riguarda il confronto con i parametri fisiologici delle piante, si osserva che il maggior incremento delle differenze nei sintomi - fenomeno che si è verificato verso la metà di luglio - si manifesta in corrispondenza della diminuzione del contenuto di clorofilla, dell'indice di performance e della resa quantica massima; l'incremento dei sintomi è invece preceduto da una diminuzione delle differenze dei valori del parametro ΔV_{I-P} ; tali differenze tendono successivamente ad attenuarsi (Figura 2.16b,c).

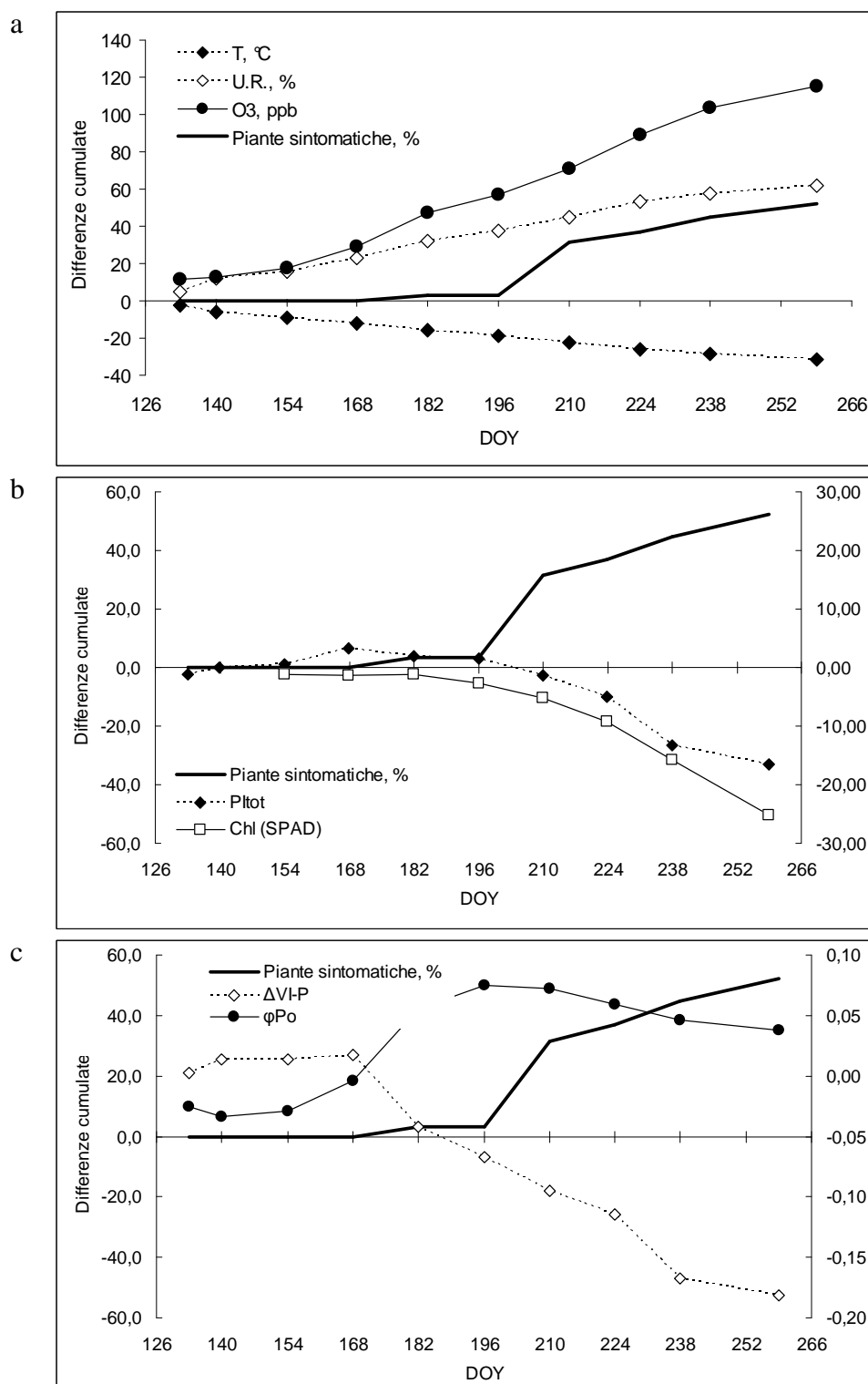


Figura 2.16. Sviluppo temporale delle differenze cumulate nella frequenza di piante sintomatiche dei due siti (Margone – Lasino) e: a) temperatura, umidità relativa, concentrazione di ozono; b) contenuto di clorofilla (SPAD), Performance Index; c) $\Delta VI-P$, ϕPo .

Correlazioni tra differenze cumulate

In Tabella 2.6 sono riportate le correlazioni per ranghi di Spearman tra le serie temporali delle differenze nei predittori e negli indicatori di risposta. Le differenze nei predittori (T, U.R., O₃) sono risultate significativamente correlate con le differenze nella percentuale di piante sintomatiche, con il contenuto di clorofilla e con gran parte dei parametri del JIP-test; non sono risultate significative le relazioni con la fluorescenza massima (F_M), con la resa quantica massima (φ_{P0}) e con l'indice di performance.

Tabella 2.6. Correlazioni per ranghi di Spearman tra le serie temporali delle differenze nei predittori (T, temperatura; U.R., umidità relativa; O₃, concentrazioni di ozono) e negli indicatori di risposta (percentuale di piante sintomatiche; contenuto di clorofilla SPAD (Chl); parametri del JIP-test: F₀, F_M, φ_{P0}, W_(OK)100, W_(OJ)300, ψ₀, ΔV_{I-P}, PI_{TOT}). In grassetto sono evidenziate le correlazioni significative per P < 0,05.

	Piante sintomatiche, %	Chl (SPAD)	F ₀	F _M	φ _{P0}	W100	W300	ψ ₀	ΔV _{I-P}	PI _{TOT}
T, °C	-0,966	0,929	0,818	-0,588	-0,612	0,794	0,661	-0,770	0,891	0,624
U.R., %	0,966	-0,929	-0,818	0,588	0,612	-0,794	-0,661	0,770	-0,891	-0,624
O ₃ , ppb	0,966	-0,929	-0,818	0,588	0,612	-0,794	-0,661	0,770	-0,891	-0,624

Le correlazioni tra i parametri ambientali T e U.R. e gli indicatori di risposta sono verosimilmente da ascrivere alla co-variazione che esiste tra tali parametri e le concentrazioni di ozono (vedi Tabella 2.4); ciò nonostante è da notare che la contemporanea presenza di alte concentrazioni di ozono, elevata U.R. e temperature non eccessivamente elevate potrebbero costituire la condizione ottimale per un maggior uptake di ozono: tale situazione si verifica a Margone, in contrapposizione con Lasino dove si rilevano concentrazioni di ozono più basse, minor U.R. e temperature più elevate (tali da supporre chiusura stomatica per limitare la traspirazione).

Le differenze tra i siti in termini di concentrazioni di ozono appaiono influenzare positivamente la percentuale di piante sintomatiche e negativamente il contenuto di clorofilla ed i parametri del JIP test (tranne ψ₀).

2.4 Discussione

L'obiettivo di questo lavoro era verificare – in condizioni reali di campo – la capacità di *V. lantana* di rispondere all'esposizione all'ozono durante il periodo vegetativo (uno dei requisiti per considerare un organismo come bioindicatore; vedi capitolo 1.5). A tale scopo sono stati rilevati alcuni indicatori di risposta (sintomi fogliari, contenuto di clorofilla, fluorescenza della clorofilla *a*) su piante spontanee esposte a due differenti livelli di ozono; contemporaneamente sono stati misurati anche temperatura, umidità relativa e ozono.

E' stato innanzitutto verificato che, su questa specie, i sintomi fogliari indotti dall'ozono sono di facile riconoscimento anche in campo e su piante spontanee. Quest'aspetto è particolarmente importante poiché il rilievo dei sintomi fogliari è sempre più considerato una tecnica rapida ed economica per valutare situazioni di stress delle piante imputabili ad inquinanti (Doley, 2010).

Le piante hanno sviluppato sintomi da luglio a settembre – periodo di massima presenza dell'ozono nel corso dell'anno. Le maggiori frequenze di piante sintomatiche sono state rilevate dove l'esposizione all'ozono era più elevata. Da notare che in entrambi i siti l'insorgenza dei sintomi si è verificata a valori di AOT40 decisamente più alti dei livelli critici per la vegetazione.

Lo sviluppo temporale dei sintomi nei due siti è avvenuto in modo differente, con un ritardo nell'insorgenza ed un incremento della frazione di piante sintomatiche più lento nel sito a basso ozono. Questo comportamento può essere imputabile a diversi fattori. E' noto che le concentrazioni di ozono in aree montane tendono ad aumentare con la quota (Bacaro *et al.*, 2008); data la riscontrata covariazione delle variabili ambientali (T e U.R.) con la quota, le concentrazioni più alte di ozono sono state riscontrate dove l'umidità relativa era più alta e la temperatura (relativamente) più bassa: questa situazione può aver favorito un maggior assorbimento stomatico di ozono a Margone (sito ad alto ozono). Se si considera lo stress ossidativo complessivo (ozono e radiazione solare), che a Margone è plausibilmente maggiore che a Lasino (sito a basso ozono e quota inferiore), possiamo ragionevolmente aspettarci – a parità di esposizione all'ozono – una maggiore frequenza di piante sintomatiche a Margone rispetto a Lasino (situazione che è stata effettivamente riscontrata). Ulteriore evidenza del fatto che vi sia un'interazione di differenti fattori di stress ossidativo è la presenza di pigmentazioni fogliari dovute all'accumulo di antociani, frequentemente osservate a Margone. Come descritto da Bussotti *et al.* (2005), l'accumulo di antociani è una risposta aspecifica di *V. lantana* per proteggere i cloroplasti da un eccesso di eccitazione attraverso l'attivazione di un processo di dissipazione dell'energia. Il differente comportamento tra i due siti potrebbe essere spiegato anche con un "effetto diluizione": l'esposizione all'ozono cumulato (AOT40) avviene più lentamente dove i livelli sono più bassi, cosicché la pianta avrebbe il tempo per

“preparare” le difese nei confronti di questo stress e/o di sviluppare processi di detossificazione (Gravano *et al.*, 2004).

Le differenze tra i due siti in termini di frequenza di sintomi fogliari hanno mostrato un andamento analogo a quello delle differenze del contenuto di clorofilla: pur trattandosi di un indicatore non specifico per l’ozono, il contenuto di clorofilla misurato con il clorofillometro SPAD potrebbe comunque essere utilizzato come indicatore - di facile e veloce acquisizione - di un generico stato di sofferenza della pianta.

Considerando i parametri elaborati dal transient di fluorescenza della clorofilla *a*, le differenze tra i due siti evidenziano variazioni più marcate del tratto di curva I-P (ΔV_{I-P}) per il sito ad alto ozono, ad indicare una compromissione degli eventi oltre il PSI. Tali eventi includono una minor densità del PSI ed una ridotta capacità degli accettori finali (ferridossina, NADP+) di gestire efficacemente il flusso di elettroni. Gli elettroni liberi (quelli che provengono dal PSI ma che non raggiungono gli accettori finali) possono causare la produzione di ROS (*Reactive Oxygen Species*) che a loro volta inducono processi di ossidazione del contenuto cellulare. Gli eventi della fase I-P sono già stati individuati da altri autori (Bussotti *et al.*, 2011a) come indicatori specifici di danno da ozono.

Relativamente all’analisi della fluorescenza della clorofilla *a*, è da notare che la quasi totalità dei lavori riportati in letteratura si riferisce ad esperimenti in ambiente controllato. Con questo studio si sono voluti prendere in considerazione aspetti metodologici connessi all’intrinseca variabilità del materiale sperimentale (piante spontanee) e delle condizioni sperimentali (misure in campo) allo scopo di valutare l’applicabilità della tecnica anche in condizioni reali di campo. Come si poteva supporre, esiste una certa variabilità tra i valori misurati su diverse foglie della stessa pianta e tra piante diverse, all’interno dello stesso sito. In fase di pianificazione del disegno sperimentale, e nella definizione delle numerosità campionarie, è importante tenere in considerazione che la variabilità è maggiore tra le foglie della stessa pianta che non tra piante dello stesso sito. Un altro aspetto metodologico importante emerso dal lavoro è la variabilità dei dati di fluorescenza legata all’ora di acquisizione. In generale, si conferma la necessità di definire rigorosi disegni sperimentali che tengano in considerazione la variabilità del materiale sperimentale (Amoriello *et al.*, 2003; Ferretti, 2009; Bussotti *et al.*, 2011b).

I risultati ottenuti con questo lavoro hanno permesso di verificare che *V. lantana* è in grado di rispondere all’ozono durante il periodo vegetativo con sviluppo temporale dei sintomi, contenuto di clorofilla e performance fotosintetica, in accordo con il trend dei valori di esposizione all’ozono. Ciò nonostante, le differenze tra i due siti non sempre si sono manifestate in maniera proporzionale alle differenze di esposizione all’ozono. I motivi di tali differenze comprendono probabilmente anche l’insieme dei fattori ambientali che agiscono sui due siti con differente intensità. Tali “fattori di disturbo” sono di fatto ineludibili nel caso in cui si usino piante spontanee come bioindicatori *in situ*. La risposta del bioindicatore

riflette l'influenza di tutti i parametri ambientali che influenzano l'assorbimento stomatico di ozono (ad es. luce, temperatura, umidità relativa, disponibilità idrica del terreno, etc.) e dunque non può essere impiegato per conoscere i livelli di ozono ma piuttosto per capire il reale impatto dell'ozono sulla vegetazione. Tale impiego è particolarmente importante in aree remote e a quote elevate dove le concentrazioni di ozono tendono ad essere più alte e dove dunque è alto il rischio potenziale per la vegetazione.

3.

SECONDO STUDIO OSSERVAZIONALE IN CAMPO: ANDAMENTO SPAZIALE DEI SINTOMI FOGLIARI

Verifica del requisito (v): *Viburnum lantana* manifesta una risposta quantitativa in relazione con i livelli di esposizione all'ozono?

3.1 Introduzione

Le attività del secondo studio in campo sono state orientate a verificare l'ultimo requisito da considerare per poter qualificare come bioindicatore un determinato organismo: esiste una relazione quantitativa tra livelli di esposizione all'inquinante e risposta del bioindicatore? Una caratteristica auspicabile è, infatti, che vi sia una relazione chiara tra questo e il contaminante atmosferico. La relazione tra l'attributo d'interesse (cioè una caratteristica misurabile del bioindicatore, definita anche indicatore di risposta) e il contaminante è statisticamente rappresentabile attraverso i concetti di correlazione (il livello al quale due variabili sono tra loro relazionate) e di regressione (possibilità di prevedere il valore di una variabile dipendente da quello della variabile indipendente). Specialmente quest'ultimo aspetto è importante, poiché rende possibile stimare, con margini d'incertezza più o meno ampi, il livello di un contaminante in una data zona a partire dai dati relativi all'attributo dell'entità biologica di interesse.

L'obiettivo dello studio era di valutare l'esistenza di una relazione significativa tra livelli di esposizione all'ozono (causa) e sintomi fogliari (effetto), quest'ultimi espressi come percentuale di piante sintomatiche. A tale scopo è stata impostata un'indagine in condizioni reali di campo volta a stimare l'impatto dell'ozono attraverso la valutazione dell'effettiva presenza di sintomi fogliari sulla specie ozono-sensibile *V. lantana* esposta a livelli diversi di ozono. L'area di studio ha interessato tutta la provincia di Trento. Su tale superficie sono state individuate, secondo un disegno sperimentale messo a punto *ad hoc*, 30 celle uni-chilometriche caratterizzate dalla presenza della specie arbustiva *V. lantana*; tali celle risultavano appartenere a due classi altitudinali ed a tre classi di livelli di esposizione ad ozono (AOT40). Per ciascuna cella è stata verificata la percentuale di piante sintomatiche presenti.

3.2 Materiali a Metodi

3.2.1 Disegno sperimentale

3.2.1.1 Fasi preliminari per l'individuazione delle celle uni-chilometriche

Al fine di individuare le aree idonee sulle quali effettuare l'indagine, è stata innanzitutto considerata la distribuzione di *V. lantana* in Trentino. A tale scopo è stata utilizzata la mappa con le segnalazioni della presenza di piante spontanee di viburno grazie all'elaborazione ottenuta dal Museo Civico di Rovereto nell'ambito del progetto di Cartografia Floristica (Figura 3.1). La mappa floristica è stata sovrapposta alla mappa di rischio potenziale da ozono per la vegetazione della provincia di Trento (Figura 3.2) (Bacaro *et al.*, 2008). Tale mappa rappresenta i valori di AOT40 stimati su tutte le celle unichilometriche in cui risulta suddivisa la provincia di Trento a partire dai dati di concentrazione di ozono misurati nel 2007. Dall'intersezione delle due mappe sono stati estrapolati tutti i possibili quadrati 1x1 km idonei, ovvero tutte le celle uni-chilometriche in cui ricadeva almeno una segnalazione di presenza di *V. lantana* (Figura 3.3). Dal totale degli $N = 1256$ quadrati idonei, ne sono stati estratti $n = 30$ (+ riserve) in maniera random, secondo un disegno stratificato per quota e AOT40 (Tabella 3.1) (Figura 3.3). Il limite inferiore di AOT40 ($9.000 \mu\text{g m}^{-3}$) è stato scelto come sottomultiplo del valore obiettivo della direttiva europea ($18.000 \mu\text{g m}^{-3}$) e che approssima anche i $10.000 \mu\text{g m}^{-3}$, valore fissato dall'UN/ECE come livello critico per la protezione delle foreste.

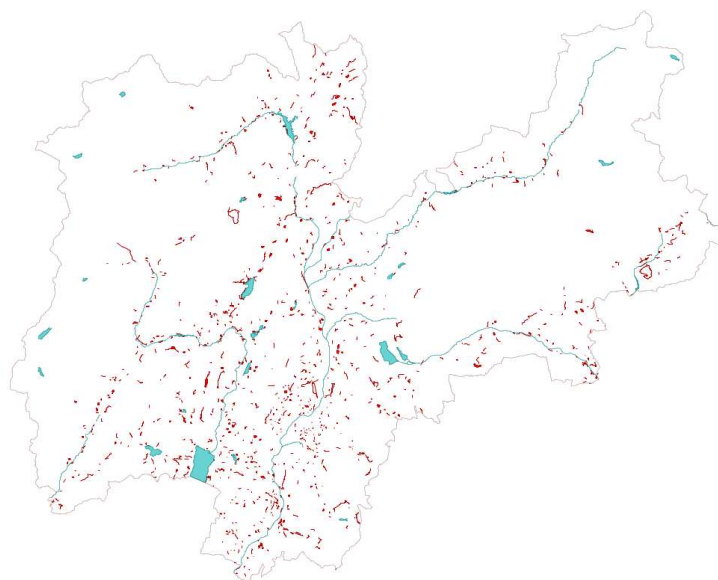


Figura 3.1. Segnalazioni di *V. lantana* nella provincia di Trento.

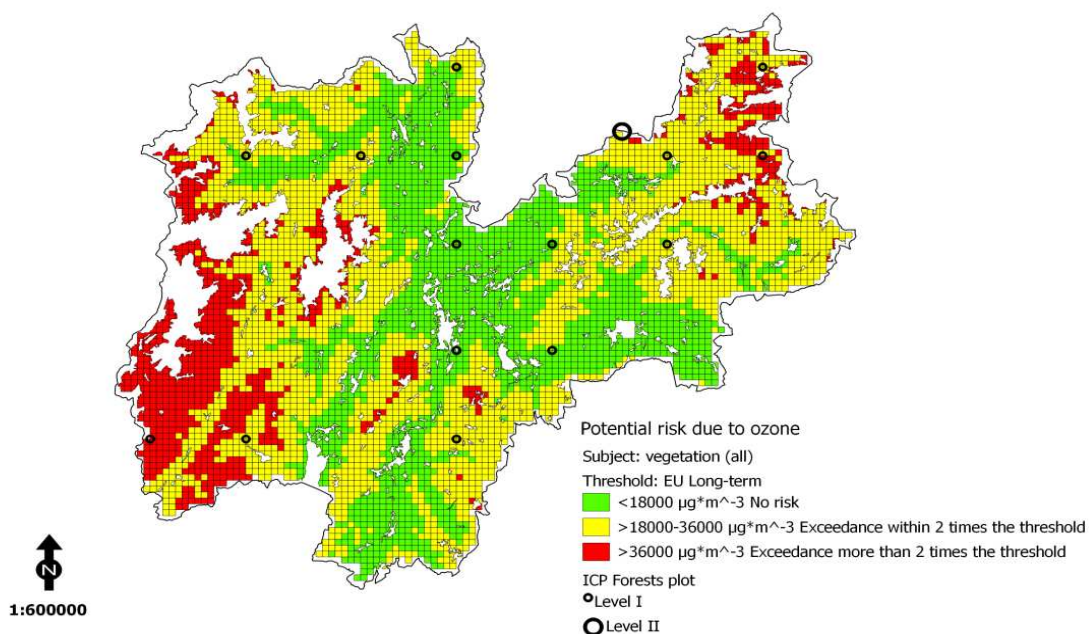


Figura 3.2. Rischio potenziale dovuto all'ozono per la vegetazione in provincia di Trento basato sul superamento di soglie di esposizione ad AOT40.

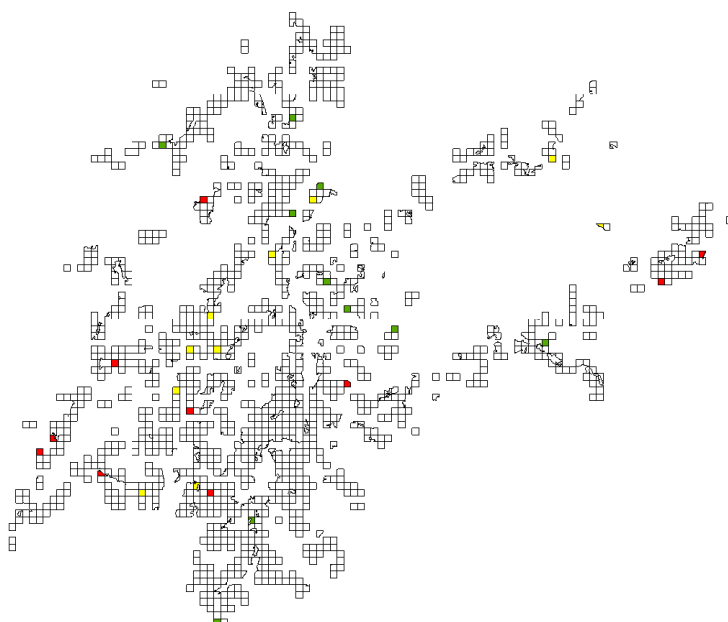


Figura 3.3. Quadrati idonei per la selezione e i 30 quadrati selezionati per i rilievi su *V. lantana* distribuiti nelle tre fasce di AOT40: <9.000 $\mu\text{g m}^{-3}$ (verde), tra 9.000 e 18.000 $\mu\text{g m}^{-3}$ (giallo), > 18.000 $\mu\text{g m}^{-3}$ (rosso).

Tabella 3.1. Disegno sperimentale: numero di quadrati da selezionare in base alla stratificazione delle celle 1x1 km secondo quota e valori di AOT40.

Fasce altitudinali	Categorie di rischio AOT40		
	$< 9.000 \mu\text{g m}^{-3}$	$9.000 - 18.000 \mu\text{g m}^{-3}$	$> 18.000 \mu\text{g m}^{-3}$
$< 700 \text{ m s.l.m.}$	5	5	5
$> 700 \text{ m s.l.m.}$	5	5	5

3.2.1.2 Procedure per l'individuazione delle piante

Per ogni quadrato selezionato, è stata localizzata la segnalazione di *V. lantana*. In caso di più segnalazioni, ne è stata scelta una casualmente. Solo in caso di assenza di un numero sufficiente di piante (vedi paragrafo successivo) sono state considerate anche le eventuali altre segnalazioni. Con l'ausilio di foto aeree, è stato identificato il centro della segnalazione; in caso di segnalazioni lineari, il centro è alla metà della lunghezza, in caso di segnalazioni areali (poligoni) il centro è il centroide del poligono. Quindi è stata localizzata l'area aperta (ampiezza dell'area \geq altezza della vegetazione circostante) più vicina al centro della segnalazione, escludendo le aree in vicinanza di strade ad elevato traffico. Le piante sono state localizzate in campo ispezionando i margini boschivi delle aree aperte individuate, partendo dal punto di accesso dell'area aperta più opportuno e procedendo in senso orario in caso di segnalazioni areali, e da sinistra a destra in caso di segnalazioni lineari (Figura 3.4).

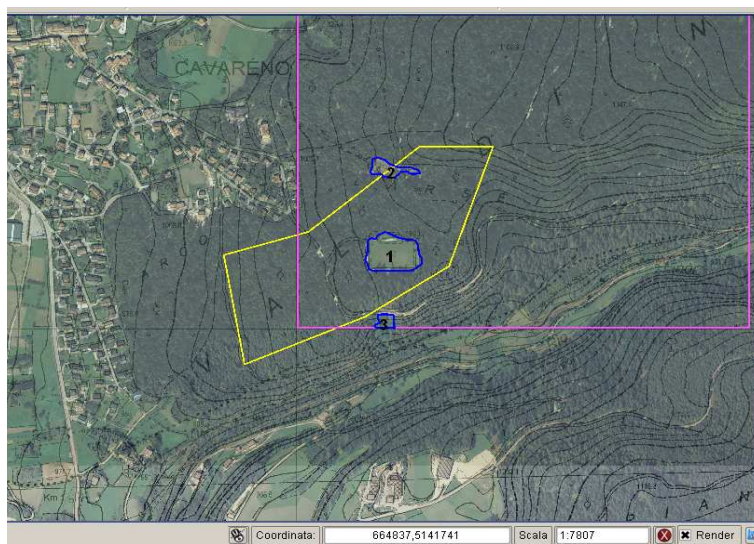


Figura 3.4. Esempio di una parte di cella uni chilometrica (rosa) con segnalazione areale di *V. lantana* (giallo) e individuazione delle tre aree aperte (blu).

3.2.2 Rilievi e numerosità

Lungo il margine boschivo ispezionato, per ogni quadrato sono state prese in considerazione tutte le piante idonee presenti (non sono state considerate piante con altezza inferiore ai 50 cm) secondo i seguenti criteri di numerosità:

- *presenti $n \geq 10$ piante di viburno*: il rilevamento è stato effettuato sino ad un massimo di $n=30$ piante;
- *presenti $10 < n < 30$ piante di viburno*: sono state ispezionate le eventuali altre due aree aperte individuate sino a raggiungere un massimo di $n=30$ piante;
- *presenti $n < 10$ piante di viburno*: si sono ispezionate successivamente le eventuali altre due aree aperte più vicine, procedendo per distanze crescenti; ci si è comunque fermati al raggiungimento di $n=30$ piante.

Il numero minimo di piante per quadrato è stato fissato in $n=10$, senza un numero minimo di piante per singola area aperta. In assenza di almeno 10 piante dopo l'ispezione della terza area aperta, si è proceduto come segue:

- in caso di altre segnalazioni nello stesso quadrato, si è reiterato il processo precedente;
- in assenza di altre segnalazioni, si è sostituito il quadrato.

Ad ogni pianta osservata sono stati attribuiti:

- un codice per i sintomi (0 = assenza sintomi; 1 = esclusivamente sintomi da ozono; 2 = altri sintomi; 3 = 2+1);
- la percentuale di foglie sintomatiche secondo le seguenti classi:
 - poco frequenti: < 5% di foglie sintomatiche
 - mediamente frequenti: da 6% a 50% di foglie sintomatiche
 - molto frequenti: > 50% di foglie sintomatiche;
- la dimensione della pianta secondo le seguenti categorie: S = piccola (50-90 cm); M = media (90-180 cm); L = grande (>180 cm).

Limiti di tempo: per standardizzare il rilevamento sono stati adottati alcuni accorgimenti. Per l'individuazione del numero sufficiente di piante è stata dedicata al massimo un'ora per area aperta. Per l'osservazione di ogni pianta e l'individuazione di eventuali sintomi da O₃ il tempo dedicato è stato calibrato sulle dimensioni della pianta: un minuto per ogni pianta di piccola (S = altezza inferiore a 90 cm) e media taglia (M = altezza tra i 90 e 180 cm); due minuti per le piante con altezza superiore ai 180 cm (L). Un altro minuto è stato utilizzato per eventuali discussioni e per l'individuazione della percentuale di foglie sintomatiche per pianta.

Sono inoltre state annotate: data di rilievo, rilevatori, numero del quadrato e della segnalazione, numero dell'area aperta; l'esposizione del margine aperto su cui è stata rilevata la pianta.

Il suddetto protocollo è stato applicato nel corso del mese di agosto 2010, realizzando i rilievi sulla vegetazione nei 30 quadrati selezionati.

3.2.3 Analisi dei dati

I valori di AOT40 delle 30 celle selezionate sono stati stimati per gli anni 2007 - 2010 a partire dai dati di concentrazione media di ozono ($\mu\text{g m}^{-3}$) riferiti ai periodi maggio-luglio di ciascuno dei 4 anni di studio. A tali valori di concentrazione è stata applicata una funzione di regressione, sviluppata mettendo in relazione un set di dati di concentrazione media di ozono misurati in siti forestali nell'ambito del progetto EFFORT dal 2007 al 2009 e i corrispondenti valori di AOT40 cumulati su periodi di 13 settimane.

Le relazioni tra le variabili (percentuali di piante sintomatiche e valori di AOT40 per quadrato) sono state valutate con correlazioni di *Pearson*. Le analisi statistiche sono state realizzate con il programma Statistica 7.1 (Statsoft 2006, Tulsa, OK, USA).

3.3 Risultati

In Tabella 3.2 è riportato l'elenco dei 30 quadrati osservati, con i rispettivi riferimenti geografici, strato di appartenenza, data e numero di piante osservate, numero e percentuale di piante sintomatiche. Complessivamente sono state osservate 676 piante, per una media di 22,5 piante per quadrato. Solo un quadrato (n. 9267) è stato ritenuto valido anche con 9 piante anziché 10, come definito dalla procedura metodologica, per l'impossibilità di sostituirlo.

Tabella 3.2. Informazioni riguardanti i 30 quadrati osservati per la valutazione della percentuale di piante di *V. lantana* con sintomi da ozono.

N QUADRATO	QUOTA CENTRO, m s.l.m.	LONG.	Y	STRATO QUOTA	STRATO AOT40	DATA RILIEVO	DOY	N PIANTE OSSERV.	N PIANTE SINTOM.	% PIANTE SINTOM.
874	421	1622029	5080025	<700	>18000	25/08/2010	237	15	7	47
2034	678	1634029	5100025	<700	>18000	19/08/2010	231	30	7	23
2224	505	1636029	5100025	<700	9000-18000	25/08/2010	237	12	3	25
2602	824	1640029	5098025	>700	>18000	27/08/2010	239	30	25	83
2730	834	1641029	5131025	>700	<9000	05/08/2010	217	23	5	22
3059	90	1645029	5080025	<700	<9000	25/08/2010	237	30	3	10
3387	1379	1648029	5123025	>700	>18000	19/08/2010	231	15	7	47
3431	1208	1649029	5072025	>700	9000-18000	11/08/2010	223	30	21	70
3440	664	1649029	5081025	<700	>18000	13/08/2010	225	13	3	23
3561	904	1650029	5107025	>700	9000-18000	09/08/2010	221	30	20	67
3617	545	1651029	5068025	<700	9000-18000	17/08/2010	229	13	1	8
3707	1272	1652029	5063025	>700	9000-18000	04/08/2010	216	30	4	13
3807	542	1653029	5068025	<700	<9000	23/08/2010	235	10	3	30
3843	366	1653029	5104025	<700	<9000	10/08/2010	222	30	1	3
3878	590	1653029	5139025	<700	<9000	09/08/2010	221	20	9	45
3915	500	1654029	5081025	<700	9000-18000	17/08/2010	229	30	21	70
4111	470	1656029	5087025	<700	>18000	10/08/2010	222	10	1	10
4115	1042	1656029	5091025	>700	>18000	25/08/2010	237	30	20	67
4305	1001	1658029	5091025	>700	>18000	03/09/2010	246	30	18	60
4319	503	1658029	5105025	<700	<9000	19/08/2010	231	23	18	78
4439	528	1659029	5130025	<700	<9000	09/08/2010	221	30	1	3
4514	209	1660029	5110025	<700	<9000	11/08/2010	223	30	3	10
4536	714	1660029	5132025	>700	<9000	09/08/2010	221	30	2	7
4760	769	1663029	5071025	>700	9000-18000	17/08/2010	229	30	30	100
5207	1562	1667029	5138025	>700	>18000	04/08/2010	216	10	1	10
6428	839	1680029	5124025	>700	<9000	26/08/2010	238	20	16	80
7449	724	1691029	5100025	>700	<9000	26/08/2010	238	13	5	38
8309	1047	1700029	5105025	>700	<9000	20/08/2010	232	20	13	65
9267	644	1710029	5113025	<700	9000-18000	20/08/2010	232	9	4	44
9931	838	1717029	5112025	>700	9000-18000	19/08/2010	231	30	1	3

In Tabella 3.3 si riporta il numero di piante suddiviso per classe di dimensione e per fascia di AOT40 e di quota, come definito dal disegno sperimentale. Il numero totale di piante riportato è inferiore di un'unità rispetto a quelle effettivamente osservate (276); ciò è dovuto al fatto che, in fase di rilievi, ad una pianta non era stata attribuita la classe di dimensione.

Complessivamente, le piante sono distribuite nelle varie classi in modo abbastanza ben bilanciato. Relativamente alla fascia di valori di AOT40, nei siti esposti a valori inferiori a $9.000 \mu\text{g m}^{-3}$ è stato osservato il gruppo più numeroso di piante (278). Considerando invece la fascia di quota, le piante sono più numerose nei siti ad alta quota (370) rispetto a quelli a bassa quota (305). Secondo la suddivisione per classi di dimensioni, la frazione prevalente di piante osservate è di taglia media, classe alla quale contribuiscono numericamente in modo consistente (116) le piante esposte a valori di AOT40 inferiori a $9.000 \mu\text{g m}^{-3}$.

Tabella 3.3. Numero di piante osservate suddivise per classe di dimensione (S, M, L), fascia di AOT40 e quota.

AOT40 $\mu\text{g m}^{-3}$	Strato QUOTA m s.l.m.	Classe di dimensione			N. totale piante osservate
		S	M	L	
<9.000	<700	34	65	74	173
	>700	33	51	21	105
<9.000 Totale		67	116	95	278
9.000-18.000	<700	21	22	21	64
	>700	43	62	45	150
9.000-18.000 Totale		64	84	66	214
>18.000	<700	22	32	14	68
	>700	36	36	43	115
>18.000 Totale		58	68	57	183
Totale complessivo		189	268	218	675

Sul totale delle piante osservate, 273 (40%) sono risultate sintomatiche per la presenza di sintomi fogliari ozono-specifici (Tabella 3.2). Delle piante sintomatiche, il 45% presentava sintomi su meno del 5% delle foglie, il 33% mostrava sintomi su meno della metà delle foglie (dal 6 al 50%) e il 22% delle piante presentava sintomi su oltre il 50 % delle foglie.

In Figura 3.5 sono rappresentati i valori medi di frequenza di piante sintomatiche suddivisi secondo la stratificazione per quota e AOT40 utilizzata come criterio di selezione delle celle da osservare. Si nota che, a parità di classe di AOT40, le piante sintomatiche sono sempre più frequenti alle quote più elevate. Per i quadrati rilevati sopra i 700 m s.l.m. si riscontra una proporzionalità tra percentuale media di piante sintomatiche e fascia di AOT40, con frequenze di piante sintomatiche più alte in corrispondenza dei valori più elevati di esposizione all'ozono.

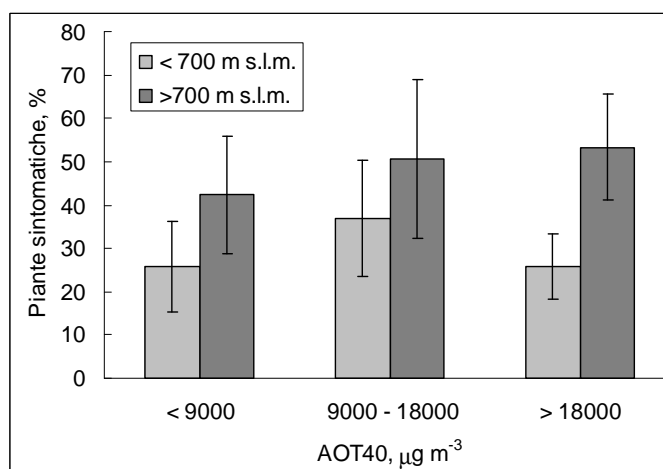


Figura 3.5. Percentuale di piante sintomatiche di *V. lantana* per livello di quota e di AOT40 definiti dal disegno sperimentale. Le barre rappresentano l'errore standard.

Considerando i dati suddivisi secondo le classi di dimensioni, i tre valori di frequenza di piante sintomatiche sono molto simili tra loro (circa il 40%) (Tabella 3.4). Se si considera la suddivisione per fascia di quota, le piante di piccole dimensioni (S) poste alle quote più alte (>700 m s.l.m.) sono quelle che rispondono in maniera più nettamente proporzionata ai livelli di esposizione all'ozono; anche se in maniera meno marcata, questa osservazione è valida anche per le piante di medie (M) e grandi (L) dimensioni. La proporzionalità tra frequenza di piante sintomatiche e AOT40 non si riscontra invece per le piante alle basse quote, di tutte e tre le classi di dimensione.

Tabella 3.4. Percentuali di piante sintomatiche per classe di dimensione e fascia di AOT40 e quota.

Strato AOT40 $\mu\text{g m}^{-3}$	QUOTA m s.l.m.	Classe di dimensione		
		S	M	L
<9.000	<700	14,7	12,3	33,8
	>700	27,3	52,9	23,8
9.000-18.000	<700	33,3	40,9	61,9
	>700	55,8	56,5	40,0
>18.000	<700	22,7	21,9	28,6
	>700	77,8	55,6	53,5
<i>Totale</i>		<i>41,3</i>	<i>39,6</i>	<i>40,4</i>

In Figura 3.7 sono rappresentati i 30 quadrati con colorazioni diverse, corrispondenti ai valori percentuali delle piante sintomatiche rilevate, suddivisi in tre classi:

- presenza infrequente: <20% di piante sintomatiche;
- presenza mediamente frequente: da 20 a 60% di piante sintomatiche;
- presenza abbondante: >60% di piante sintomatiche.

Tendenzialmente non sembra esserci un'aggregazione spaziale delle frequenze di piante sintomatiche, tranne che nel settore nord-occidentale della provincia, dove si osservano solo valori di frequenza medio - bassi (<60% di piante sintomatiche).

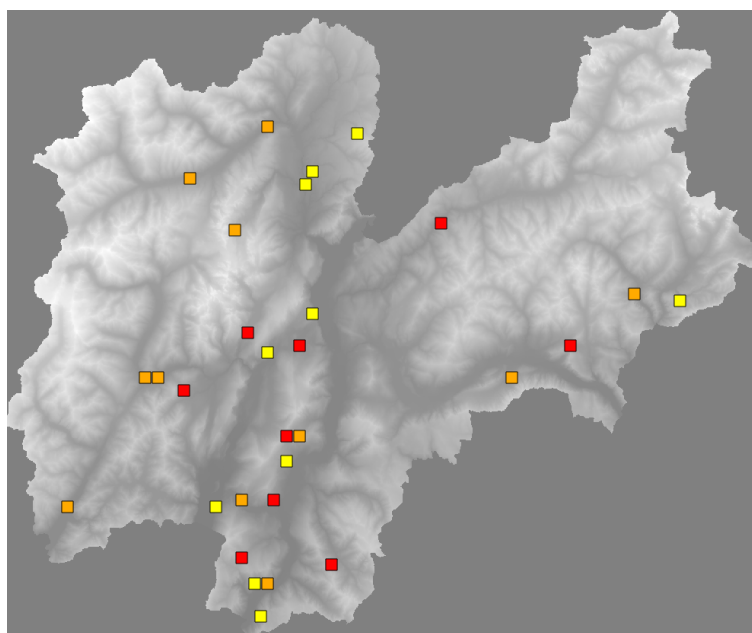


Figura 3.7. Dislocazione dei 30 quadrati nei quali sono stati effettuati i rilievi dei sintomi da ozono su piante di *V. lantana*; giallo: presenza infrequente (<20%) di piante sintomatiche; arancio: presenza mediamente frequente (da 20 a 60%) di piante sintomatiche; rosso: presenza abbondante (>60%) di piante sintomatiche.

Per cercare di minimizzare la variabilità interannuale nella stima dell'AOT40, sono stati calcolati i valori medi di esposizione per ciascuna cella sul periodo 2007-2010. I valori percentuali di piante sintomatiche rilevati su ciascun quadrato sono stati messi in relazione con i rispettivi valori medi di AOT40 (Figura 3.8). A questo livello di aggregazione dei dati, non c'è nessuna relazione significativa tra esposizione ad ozono e sintomi. Occorre però tenere presente che i dati stimati di AOT40 si riferiscono al periodo maggio-luglio, ma che le osservazioni in campo sono state svolte nel corso del mese di agosto, e che dunque le piante sono state esposte ad ulteriori dosi di ozono proporzionate alla data di rilievo, perciò non uguali per ciascun sito. E' quindi interessante notare una correlazione significativa ($r = 0,45$; $P < 0,05$) tra la percentuale di piante sintomatiche e la corrispondente data di osservazione (DOY) (Figura 3.9). Pertanto è plausibile ritenere che la data di osservazione possa riflettere indirettamente il livello di esposizione delle piante all'ozono (AOT40), valore che - per definizione - è cumulato e quindi strettamente dipendente dal fattore tempo. Da notare che risultati analoghi in termini di progressione temporale dei sintomi erano emersi anche dal primo studio in campo.

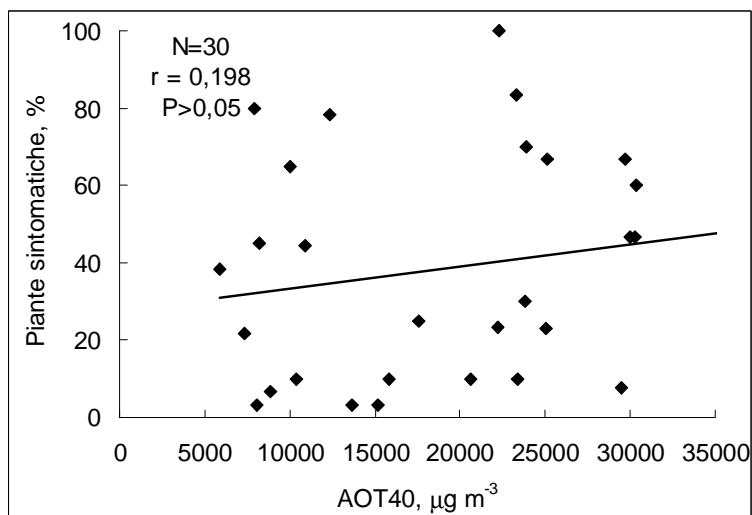


Figura 3.8. AOT40 medio sul periodo 2007-2010 in relazione al corrispondente valore percentuale di piante sintomatiche.

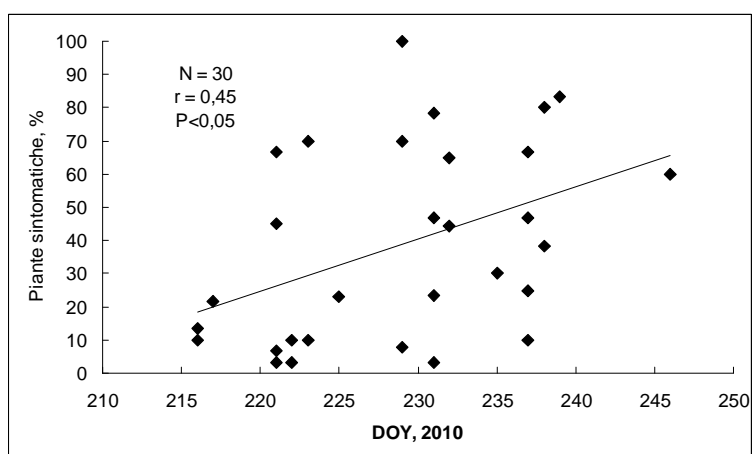


Figura 3.9. Percentuale di piante sintomatiche in relazione ai rispettivi giorni di rilievo in campo (DOY).

Discriminando i quadrati secondo il valore di AOT40 pari a 18.000 µg m⁻³ - valore stabilito dalla direttiva europea come livello critico per la protezione della vegetazione - sono state calcolate le percentuali di quadrati che ricadono nelle seguenti tre classi:

- quadrati in cui la presenza di piante sintomatiche è infrequente, $\leq 20\%$;
- quadrati in cui la presenza di piante sintomatiche è mediamente frequente, compresa tra 20% e 60%;
- quadrati in cui la frequenza di piante sintomatiche è abbondante, $\geq 60\%$.

Dalla Figura 3.10 emerge una maggiore frequenza di quadrati con una percentuale bassa - media di piante sintomatiche ($\leq 20\%$; $20\%-60\%$) in corrispondenza di valori di AOT40 inferiori a $18.000 \mu\text{g m}^{-3}$; al contrario, quelli con alta percentuale di piante sintomatiche ($\geq 60\%$) sono più frequenti in corrispondenza di valori di AOT40 maggiori di $18.000 \mu\text{g m}^{-3}$.

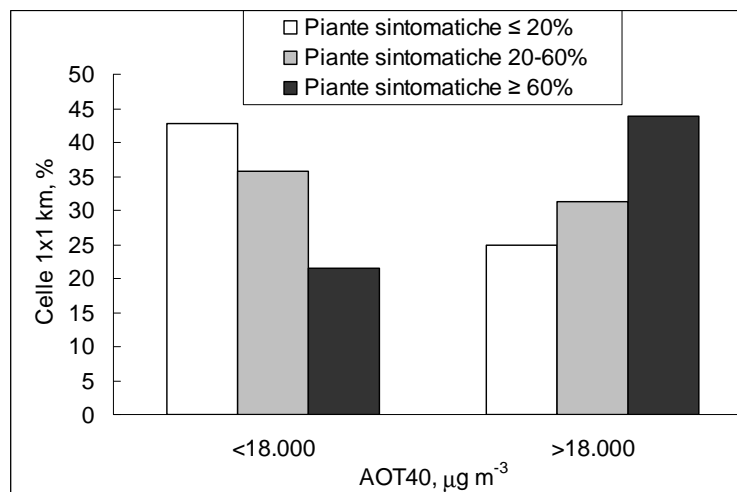


Figura 3.10. Percentuale di quadrati con frequenza di piante sintomatiche suddivise in due classi per valori di AOT40 medi 2007-2010, inferiori e maggiori di 18.000 ppb h .

Le percentuali di piante sintomatiche rilevate nel 2010 sono state messe in relazione con i valori di AOT40 stimati sui 30 quadrati negli anni 2007-2010, al fine di verificare se *V. lantana* ha un “effetto memoria” nei confronti dell’ozono, come ipotizzato da alcuni autori per altre specie (Sandermann, 1996; Soja *et al.*, 1997; Langebartels *et al.*, 1998; Sandermann, 2000). In Figura 3.11 sono rappresentati i coefficienti di correlazione per ranghi di Spearman, i quali mettono in evidenza una relazione tendenzialmente più forte tra l’indicatore di risposta e l’esposizione all’ozono degli anni precedenti i rilievi, anche se mai statisticamente significativa.

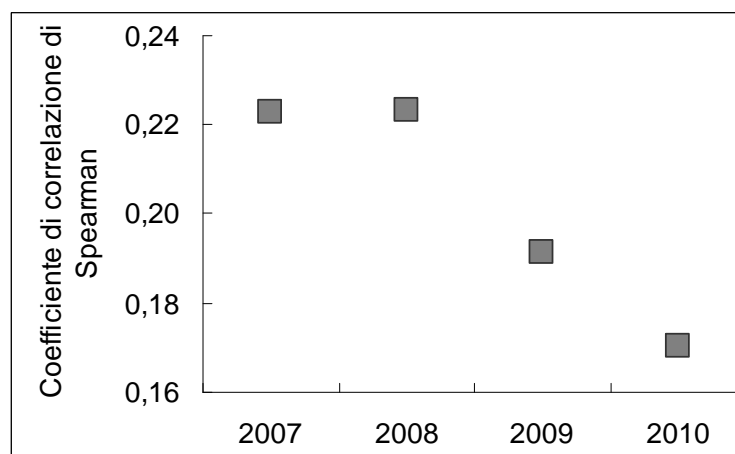


Figura 3.11. Coefficienti di correlazione per ranghi di Spearman tra percentuali di piante sintomatiche rilevate nel 2010 sui 30 quadrati 1x1 km ed i corrispondenti valori stimati di AOT40 degli anni 2007-2010.

3.4 Discussione

Obiettivo di questo secondo studio in campo era verificare l'ultimo requisito per un bioindicatore (vedi capitolo 1.5), ossia la capacità di rispondere quantitativamente in relazione ai livelli di inquinante. A tale scopo sono state selezionate, secondo un disegno randomizzato stratificato per quota e livello di AOT40, 30 celle unichilometriche su tutta la provincia di Trento. L'indicatore di risposta considerato è stato la frequenza di piante sintomatiche.

I risultati hanno evidenziato alcuni aspetti interessanti. È stata verificata una maggior probabilità di trovare elevate percentuali di piante sintomatiche (>60%) nei siti esposti ai livelli più alti di ozono (>18.000 $\mu\text{g m}^{-3}$); viceversa, dove i valori medi di AOT40 erano inferiori a 18.000 $\mu\text{g m}^{-3}$, i quadrati con poche piante sintomatiche sono risultati nettamente più frequenti.

A parità di range di valori di AOT40, le piante sintomatiche sono state mediamente più frequenti alle quote più elevate. Questo fenomeno – che conferma quanto già osservato con il primo studio in campo - può avere diverse cause. È plausibile che nei siti alle quote superiori si verifichino condizioni più favorevoli all'assorbimento stomatico dell'ozono (minor deficit idrico, temperature meno elevate) e che nel contempo le piante possano essere soggette ad ulteriori fattori di stress ossidativo (elevata radiazione solare): tali condizioni potrebbero far sì che le piante non riescano a mettere in atto tempestive e/o sufficienti strategie difensive nei confronti dell'ozono e che dunque il danno si manifesti più intensamente.

Considerando i dati ottenuti sulle 30 celle osservate, non è stata verificata una relazione significativa tra il livello di esposizione all'ozono (sia considerando il dato medio 2007-2010, sia il dato annuale) e la percentuale di piante sintomatiche (indicatore di risposta). Merita osservare che i valori di AOT40 sulle singole celle unichilometriche sono stati stimati dai dati di concentrazione, misurati su una rete di 20 punti uniformemente distribuiti, e poi spazializzati sull'intera provincia; sebbene la variabilità dei valori di ozono su una superficie unichilometrica possa essere ritenuta piuttosto limitata (Gottardini *et al.*, 2010a), è invece verosimile che i valori stimati abbiano un certo margine di incertezza, come testimoniato dalle varianze riportate da Bacaro *et al.* (2008).

Il fatto di trovare invece una correlazione significativa tra la percentuale di piante sintomatiche ed il giorno in cui è stato effettuato il rilievo conferma quanto rilevato nel primo studio in campo e può trovare spiegazione nel fatto che, al trascorrere del tempo, le piante restano comunque esposte a dosi via via maggiori dell'inquinante e dunque - in base all'ipotesi di lavoro - è più probabile che sviluppino sintomi. Idealmente, tutti i rilievi in campo si sarebbero dovuti realizzare contemporaneamente per garantire che tutte le piante fossero rimaste esposte all'ozono per lo stesso periodo; nella pratica ciò è impossibile, ed i rilievi hanno richiesto l'intero mese di agosto, in cui le concentrazioni di ozono sono solitamente piuttosto elevate. E' dunque probabile che alcuni risultati siano stati alterati dalla tempistica del rilievo.

La relazione tendenzialmente più forte riscontrata tra l'indicatore di risposta e l'esposizione all'ozono degli anni precedenti i rilievi, anche se mai statisticamente significativa, sembra comunque supportare l'ipotesi che le piante posseggano un effetto memoria nei confronti dell'ozono e che la loro risposta sia in parte determinata dai livelli di esposizione all'inquinante delle stagioni vegetative precedenti a quella in cui si verifica la risposta.

In sintesi, è possibile affermare che esiste una risposta qualitativa ma non quantitativa di *V. lantana* in relazione ai livelli di esposizione all'ozono. D'altra parte, come già discusso in precedenza (capitolo 2.4), l'interesse ad utilizzare un bioindicatore *in situ* non sta nella possibilità di stimare i livelli dell'inquinante ma piuttosto nell'opportunità di valutare l'impatto potenziale dell'ozono su vaste aree e in zone remote.

4.

SPERIMENTAZIONE IN AMBIENTE CONTROLLATO

4.1 Introduzione

Sebbene gli effetti dell'ozono su *V. lantana* – in termini di sintomi fogliari - siano ben noti, verificati da studi sia in ambiente controllato sia in campo (in questa tesi) e validati microscopicamente, non altrettanto esaustive sono le conoscenze relativamente a come tale specie risponda all'esposizione all'ozono a livello biochimico, fisiologico e genetico. In particolare non sono completamente chiare le relazioni tra contenuto fogliare di clorofilla, funzionalità dell'apparato fotosintetico e ripercussioni sul metabolismo primario dei carboidrati ed il ruolo dei pigmenti accessori nella protezione del sistema fotosintetico. Da un punto di vista genetico, poi, non vi sono conoscenze specifiche relative a come *V. lantana* reagisca all'esposizione ad ozono, a quali geni vengano repressi e/o indotti in seguito a trattamento con l'inquinante.

E' noto come un'esposizione di tipo cronico all'ozono, caratterizzata da concentrazioni medio - basse d'inquinante per un periodo prolungato, sia in grado di determinare riduzioni della fotosintesi e dell'accrescimento (Heath, 1994) e di accelerare i processi di senescenza fogliare (Castagna & Ranieri, 2009). Anche in piante di *V. lantana* trattate con ozono è stata osservata una riduzione dell'efficienza fotosintetica ed una riduzione dell'assimilazione di CO₂ (Bussotti *et al.*, 2005; Calatayud *et al.*, 2010). Tale specie mostra inoltre alterazione dei cloroplasti e senescenza precoce (Gravano *et al.*, 2004). La misura della fluorescenza della clorofilla *a* può fornire indicazioni utili sulla fisiologia dell'organismo vegetale in esame poiché, seppur in modo complesso e limitatamente al PSII, essa può essere indicativa dell'attività fotosintetica. Uno dei principali effetti dell'ozono riguarda, infatti, proprio il processo fotosintetico e consiste nella riduzione dell'attività e/o della quantità (Goumenaki *et al.*, 2010) della Rubisco – enzima chiave del ciclo di Calvin – a causa dell'alterazione strutturale e funzionale della molecola provocata dai derivati ossidanti dell'ozono. Come conseguenza si ha la riduzione della fissazione della CO₂ e dunque una diminuzione nella produzione di carboidrati (zuccheri solubili ed amido) (Keutgen *et al.*, 2005). La riduzione del tasso fotosintetico ha una conseguente azione feedback sulla capacità fotochimica (Reichenauer *et al.*, 1997) che a sua volta promuove un meccanismo di fotoinibizione. La fotoinibizione (inibizione luce-dipendente della fotosintesi) comporta una diminuzione del trasferimento dell'energia di eccitazione ai centri di reazione del PSII e l'innescio di un processo che porta al danneggiamento del fotosistema stesso (Adir *et al.*, 2003). Nel

contrastare tale sequenza di eventi dannosi è di cruciale importanza il meccanismo di dissipazione dell'eccesso d'energia luminosa attraverso il ciclo delle xantofille (Adams & Demmig-Adams, 1995; Ciompi *et al.*, 1997; Ranieri *et al.*, 2001). Le xantofille rappresentano uno dei principali gruppi di carotenoidi, normalmente presenti come pigmenti accessori nei complessi antenna dei due fotosistemi (LHCI e LHCII) dove consentono di ampliare lo spettro di assorbimento degli organismi fotosintetici. I carotenoidi assorbono la radiazione a lunghezze d'onda diverse rispetto alle clorofille, ma agiscono sinergicamente con esse per aumentare l'efficienza di assorbimento della luce. Un'altra funzione importante dei carotenoidi è di proteggere i lipidi dei cloroplasti dalla fotossidazione (dovuta ad alte radiazioni luminose). I carotenoidi possono catturare l'energia in eccesso dalle molecole di clorofilla eccitate impedendo la formazione di singoletti di ossigeno e di ROS. Tra le xantofille rivestono particolare importanza violaxantina, anteraxantina e zeaxantina, coinvolte in un processo di dissipazione termica dell'energia in eccesso, noto come ciclo delle xantofille. Tale ciclo prevede la conversione della violaxantina a zeaxantina, attraverso l'intermedio anteraxantina, tramite reazioni di de-eossidazione, e il cammino inverso per via eossidativa (Figura 4.1).

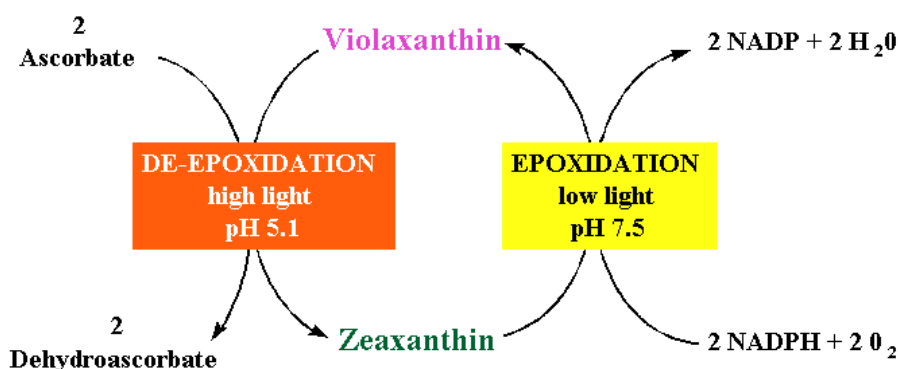


Figura 4.1. Ciclo delle xantofille (<http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm>).

Nel PSII la formazione di zeaxantina attraverso le reazioni di de-eossidazione del ciclo delle xantofille è essenziale per la dissipazione termica pH-dipendente dell'energia luminosa assorbita (Niyogi *et al.*, 1998).

Da un punto di vista genetico, è noto che le piante hanno sviluppato complicati meccanismi di percezione e trasduzione del segnale di stress abiotici che determinano l'attivazione o la repressione di particolari geni (Hirayama & Shinozaki, 2010). È stato osservato che l'esposizione all'ozono provoca l'induzione di geni coinvolti anche in sistemi di difesa contro patogeni (Savenstrand *et al.*, 2000; Rizzo *et al.*, 2007) e di geni coinvolti nella sintesi di molecole coinvolte nella struttura cellulare (Olbrich *et al.*, 2005).

Il presente studio svolto in ambiente controllato è stato impostato con lo scopo di valutare se, e in che misura, l'esposizione all'ozono alteri l'aspetto funzionale della pianta - inteso in termini di efficienza fotosintetica, di sintesi dei pigmenti fotosintetici e dei carboidrati - e l'aspetto genico - inteso come differente espressione di geni in piante esposte ad ozono rispetto a quelle di controllo.

Gli studi in ambiente controllato offrono il vantaggio di poter, per l'appunto, controllare i diversi parametri ambientali in grado di influire sul comportamento delle piante quali temperatura, luce, rifornimento idrico e nutrienti. Adottando tale approccio metodologico per la realizzazione di questo studio, si mira a valutare l'effetto dell'ozono eliminando l'interferenza dei fattori che potrebbero alterare l'assorbimento stomatico di questo inquinante e dunque la risposta della pianta. Le informazioni ottenute attraverso la realizzazione dello studio in ambiente controllato consentono sia di approfondire le conoscenze circa agli effetti dell'ozono su *V. lantana* sia di acquisire elementi utili per interpretare le risposte ottenute attraverso gli studi in campo (capitoli 2 e 3).

Per la realizzazione di questa parte di studio, un gruppo di piante di *V. lantana* - provenienti da vivaio e mantenute in vaso - è stato trattato con ozono 60 ppb per 5 ore al giorno, per 45 giorni consecutivi; tale dose di ozono è stata scelta sulla base di quanto riportato in letteratura e considerando le condizioni di esposizione a livelli medi di ozono a cui le piante sono sottoposte in condizioni reali, in modo da simulare una situazione di inquinamento cronico da ozono.

Sui campioni vegetali, trattati con ozono e non, sono state eseguite una serie di analisi che hanno riguardato alcuni indicatori, morfologici, fisiologici, biochimici e genetici, coinvolti nei meccanismi di risposta delle piante allo stress da ozono. L'attenzione è stata dunque rivolta allo studio degli effetti dell'inquinante su:

- sviluppo temporale e intensità dei sintomi fogliari, al fine di verificare la relazione dose/risposta;
- apparato fotosintetico, attraverso misure *in vivo* del contenuto di clorofilla e della fluorescenza della clorofilla *a* e attraverso la valutazione tramite HPLC del contenuto fogliare dei pigmenti fotosintetici e accessori, con particolare riferimento all'analisi del ciclo fotoprotettivo delle xantofille; tali analisi sono finalizzate a valutare se *V. lantana* sia in grado di rispondere al trattamento con ozono attivando meccanismi di protezione contro la fotoinibizione del PSII (riduzione del contenuto in pigmenti fotosintetici) e contro gli eventi fotoossidativi (attraverso la riduzione del contenuto in β -carotene);
- metabolismo primario, attraverso la valutazione tramite HPLC del contenuto fogliare di carboidrati;
- espressione genica, mediante l'applicazione della tecnica d'ibridazione sottrattiva soppressiva che permette di costruire librerie di cDNA dei geni indotti e repressi dal trattamento in esame.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Materiale vegetale e condizioni di crescita

Circa 30 piante di *V. lantana* provenienti dal vivaio forestale “Casteller” di Trento sono state portate alla fine di maggio 2009 presso il Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose “Giovanni Scaramuzzi” dell’Università di Pisa. Le piante erano state riprodotte per talea, cresciute in vasi del diametro di 30 cm ed avevano un’altezza di circa 50 cm.

Inizialmente tutte le piante sono state mantenute in serra per una fase di acclimatazione; successivamente ne sono state preferenzialmente selezionate 18 per la loro particolare rigogliosità e trasferite in cella climatica Bertagnin ad aria filtrata (Proclimatic s.r.l., Imola, Italia). La cella climatica nella quale sono state allevate le piante ha una dimensione utile di 2,70 x 2,90 x 2,0 m; al suo interno i parametri ambientali luce, temperatura e umidità relativa possono essere controllati e mantenuti sui valori scelti attraverso sistemi automatici. Per la sperimentazione con le piante di *V. lantana* le condizioni sono state le seguenti: temperatura di 20 ± 1 °C; $85 \pm 5\%$ RH; $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di radiazione fotosinteticamente attiva (PAR: λ 400-700 nm); 15 ore di fotoperiodo. Le piante sono state mantenute in condizioni ottimali di rifornimento idrico ed edafico (fertirrigazione) ed in presenza di aria filtrata attraverso carbone attivo per 90 giorni.

4.2.2 Descrizione delle condizioni di fumigazione

Al termine del periodo di adattamento in cella climatica, nove piante scelte casualmente tra le 18 sono state trasferite in un box presente all’interno della cella climatica stessa per essere fumigate con ozono; contemporaneamente le altre nove piante sono state lasciate nella cella e usate come controllo.

La camera utilizzata per la fumigazione con ozono (Figura 4.2) consiste in un box di Perspex® (Shenzhen Dongke Plastic Packing Co., Ltd, Shenzhen, P.R. China) con dimensioni: 1,30 x 0,75 x 1,00 m, ventilato continuamente con aria proveniente dalla cella stessa immessa in continuo con un flusso di ricambio totale capace di garantire due cambi di aria al minuto, previa filtrazione per carbone attivo. L’ingresso dell’aria nel box avviene attraverso 5 fori (0,05 m di diametro), disposti su uno dei lati minori, ed è mediato dalla presenza di una piastra di Perspex®, anch’essa forata, che, rompendo i filetti d’aria in ingresso, ne assicura una sufficiente omogeneizzazione. L’aria viene aspirata attraverso un foro (0,1 m di diametro) praticato nel lato opposto a quello di entrata, filtrata ed immessa all’esterno mediante un aspiratore-depuratore Maczero Toxigas 900 (Aeron S.r.l., Milano, Italia). Il flusso è intercettato, ad una distanza di 0,4 m dal punto di ingresso nella camera, da un tubetto

di teflon (0,005 m di diametro) che convoglia l'ozono all'interno del box, permettendo un'adeguata miscelazione con la massa di aria in entrata.

L'O₃ è formato a partire da O₂ puro in bombola, attraverso una scarica elettrica prodotta da uno specifico generatore Fisher 500 (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) raffreddato ad aria; la sua quantità in uscita è funzione dell'intensità della scarica elettrica e del flusso di O₂ in entrata al generatore.

La concentrazione all'interno del box è misurata in continuo; la miscela aria - O₃, campionata mediante un tubetto in teflon posto all'altezza delle piante, è convogliata ad un analizzatore automatico Mod. 8810 (Monitor Labs Inc., Englewood, CO, USA), funzionante in base al principio dell'assorbimento della luce UV. Lo strumento è connesso ad un registratore su carta a due tracce Mod. 2210 Bromma recorder (LKB Producter, Bromma, Sweden) e ad un sistema computerizzato basato su un PC dotato di specifico software.

Le fumigazioni sono state effettuate con una concentrazione di ozono di 60 ppb per 5 h al dì, per un periodo di 45 giorni (21 luglio - 4 settembre 2009).



Figura 4.2. Camera utilizzata per la fumigazione delle piante di *V. lantana* con ozono.

4.2.3 Disegno sperimentale, numerosità campionarie, campionamento

Su ciascuna delle 18 piante selezionate sono state individuate casualmente, e marcate permanentemente, 5 foglie ben sviluppate, escludendo quelle giovani apicali. Tutte le foglie contrassegnate sono state oggetto delle osservazioni e delle analisi secondo lo schema riportato in Tabella 4.1. A ciascuno dei quattro tempi sono dunque state effettuate le misure

non distruttive del contenuto di clorofilla SPAD e della fluorescenza diretta della clorofilla *a*; la fluorescenza modulata è stata misurata solo ai tempi $T = 0$ e 30 giorni. Le analisi del contenuto di pigmenti fotosintetici sono state effettuate dopo 15, 30 e 45 giorni dall'inizio del trattamento. La sperimentazione è iniziata il 21.7.2009 e si è conclusa il 4.9.2009.

Tabella 4.1. Schema delle misure ed analisi effettuate sulle piante utilizzate per la sperimentazione in ambiente controllato. Per ciascun tempo (T = numero di giorni dall'inizio della fumigazione) ed analisi è riportato il numero di piante fumigate (F) e di controllo (C) utilizzate.

Tempo, gg	Sintomi fogliari	Clorofilla (SPAD)	Fluorescenza diretta	Fluorescenza modulata	Pigmenti fotosintetici	Carboidrati
$T = 0$	9 F + 9 C	9 F + 9 C	9 F + 9 C	9 F + 9 C		
$T = 15$	9 F + 9 C	9 F + 9 C	9 F + 9 C		3 F + 3 C	3 F + 3 C
$T = 30$	6 F + 6 C	6 F + 6 C	6 F + 6 C	6 F + 6 C	3 F + 3 C	3 F + 3 C
$T = 45$	9 F + 3 C	9 F + 3 C	9 F + 3 C		3 F + 3 C	3 F + 3 C

Ai tempi $T = 15, 30$ e 45 giorni sono state tolte dalla sperimentazione 3 piante del Trattato (fumigate F) e 3 del Controllo (C), selezionate di volta in volta in maniera casuale tra quelle restanti. Tali piante sono state utilizzate per prelevare le foglie da destinare alle analisi biochimiche. Per il campionamento delle foglie, le piante sono state precedentemente mantenute al buio per 30 minuti; subito dopo, ogni foglia marcata è stata staccata dalla pianta, privata della nervatura centrale e suddivisa in piccole porzioni con lama da bisturi in modo da preparare campioni in triplicato con i seguenti quantitativi:

- 0,3 g per l'analisi del contenuto in carboidrati;
- 0,03 g per l'analisi dei pigmenti fotosintetici.

Eventuale materiale in esubero è stato conservato come campione composito a livello di foglia.

Su ciascun campione è stato segnato il peso esatto. I campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Per la realizzazione delle analisi genetiche di ibridazione sottrattiva soppressiva si è reso necessario installare una nuova prova sperimentale di fumigazione, poiché il materiale vegetale conservato dalla prima prova non era sufficiente per l'estrazione dei quantitativi di RNA necessari per effettuare l'analisi di PCR-select. Quindi nella primavera 2011 un gruppo di 12 piante scelte tra quelle non utilizzate nella precedente sperimentazione e mantenute fino ad allora in serra, sono state dapprima acclimatate in cella climatica per 6 giorni e quindi una parte di esse ($n=6$) è stata sottoposta al trattamento con ozono per 15 giorni (Trattamento) ed

altrettante sono state mantenute in cella climatica (Controllo), adottando le medesime condizioni descritte nel capitolo 4.2.2.

4.2.4 Metodologie analitiche

4.2.4.1 Sintomi fogliari

A ogni rilievo, ciascuna pianta è stata classificata come sintomatica o non in base alla presenza o assenza di sintomi fogliari. Inoltre a ciascuna delle 5 foglie individuate su ogni pianta è stata attribuita la percentuale di superficie interessata dalla presenza di sintomi, espressa in classi del 5%.

Per i dettagli sulla metodica utilizzata per il rilievo dei sintomi fogliari si rimanda a quanto già descritto nel capitolo 2.2.3.1.

4.2.4.2 Contenuto di clorofilla (SPAD)

Il contenuto di clorofilla è stato misurato *in vivo* su ciascuna delle 5 foglie individuate su ogni pianta, e ad ogni tempo, utilizzando un clorofillometro portatile SPAD.

Per i dettagli sulla metodica utilizzata per la misura del contenuto fogliare di clorofilla SPAD si rimanda a quanto già descritto nel capitolo 2.2.3.2.

4.2.4.3 Fluorescenza diretta della clorofilla *a*

La fluorescenza diretta della clorofilla *a* è stata misurata su ciascuna delle 5 foglie individuate su ogni pianta, e ad ogni tempo, seguendo la metodica descritta nel capitolo 2.2.3.3.

4.2.4.4 Fluorescenza modulata della clorofilla *a*

La fluorescenza modulata della clorofilla *a* è stata misurata con la tecnica “Pulse – Amplitude – Modulated” (PAM) usando il Diving-PAM (Walz GmbH, Effeltrich, Germania). Ad un campione adattato al buio viene dato un impulso di luce modulata (ML = modulated light) molto debole, ma in grado di causare la fluorescenza della clorofilla. ML è originata da un sistema di diodi (LED) che emettono radiazioni nello spettro del rosso (di solito $\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$). La debole radiazione iniziale non ha effetto d'induzione della fotosintesi, la fluorescenza della clorofilla proviene principalmente dalla perdita di energia dall'antenna, quindi il suo valore può essere assunto come F_0 .

Successivamente viene somministrato un impulso di saturazione (SP = saturation pulse) per un tempo di circa 0,8 s. Si tratta di un impulso con intensità molto forte, fino a $16.000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LED, $\lambda_{\max} = 665 \text{ nm}$), che causa la riduzione di tutti gli accettori del PSII, il blocco momentaneo delle reazioni fotochimiche e, come conseguenza, l'aumento

dell'intensità della fluorescenza fino a raggiungere il valore massimo (F_M). Dopo che l'intensità della fluorescenza è tornata al livello di F_0 , viene nuovamente somministrata una luce attinica con PPFD (*Photosynthetic photon flux density*) = 200-500 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LED, $\lambda_{\text{max}} = 665 \text{ nm}$). Questa luce consente alla fluorescenza di salire nuovamente fino a F_P , che rappresenta il picco di fluorescenza relativo alla luce attinica. Nei minuti successivi la fluorescenza diminuisce nuovamente fino al livello costante (stabile) di F_S (*steady*), che rappresenta l'equilibrio fra le diverse fasi della fotosintesi.

Dopo che è stato raggiunto F_S (circa 240 secondi da F_P), viene somministrato il secondo impulso che riduce nuovamente gli accettori di elettroni del PSII. Questo impulso provoca un nuovo aumento di fluorescenza fino al livello F'_M , che è sempre inferiore a F_M . La differenza tra F_M e F'_M è dovuta all'estinzione non fotochimica di energia. In seguito, un impulso di luce nel rosso lontano (far red, FR) (30 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 720–730 nm), in assenza di luce attinica (Maxwell e Johnson, 2000) consente di misurare F'_0 , che rappresenta il livello minimo di fluorescenza quando i centri di reazione del PSII sono massimamente aperti in una foglia adattata alla luce. Si assume che in tal modo (debole luce nel rosso lontano in assenza di luce attinica) venga eccitato preferenzialmente il PSI rispetto al PSII, rimuovendo in tal modo gli elettroni dal sito degli accettori del PSII (ossidazione del pool dei plastochinoni associati al PSII) e favorendo l'apertura dei centri di reazione del PSII.

La fluorescenza modulata consente, in particolare, l'analisi del quenching, cioè dei processi che portano all'estinzione della fluorescenza stessa. Questa estinzione può avvenire a causa del trasporto degli elettroni fuori dal PSII, con un meccanismo indotto dall'attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio, ed è chiamata "estinzione fotochimica" (photochemical quenching, PQ). Un processo parallelo riguarda la conversione dell'energia in calore, ed è denominato "estinzione non-fotochimica" (non photochemical quenching, NPQ). Tipicamente le variazioni che avvengono a causa di questi due processi durano circa 15–20 min, prima che si raggiunga lo stato costante di fluorescenza (FS).

L'analisi è stata effettuata utilizzando un fluorimetro a luce modulata (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germania) dopo 20' di adattamento al buio delle foglie. La fluorescenza è stata eccitata con luce rossa modulata ($\lambda = 650 \text{ nm}$); la foglia è stata quindi illuminata per 0,8'' con luce a elevata intensità ($8.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in modo da indurre la produzione di F_M .

I parametri di fluorescenza modulata considerati per il presente studio – oltre ad F_0 e F_M – sono i seguenti:

$$- F_V / F_M = (F_M - F_0) / F_M$$

Questo parametro rappresenta la massima resa quantica della fotochimica primaria in campioni adattati al buio. Fornisce una stima dell'efficienza fotochimica massima del PSII ad una data PPFD, che corrisponde all'efficienza operativa del PSII quando tutti i centri di reazione del PSII sono aperti (QA ossidato). La riduzione del valore di questo parametro è accompagnata dall'aumento della de-epossidazione delle xantofille.

$$\text{- Yield (o effective quantum yield)} = (F'_M - F'_S) / F'_M = \Delta F / F'_M = F'_q / F'_M = \Phi_{\text{PSII}}$$

Questo parametro consente di valutare la resa quantica effettiva delle reazioni fotochimiche nel PSII, in foglie adattate alla luce (Genty *et al.*, 1989). L'effective quantum yield misura la proporzione di luce assorbita che è usata per alimentare le reazioni fotochimiche, quindi l'efficienza è influenzata fra l'altro dal livello degli accettori di elettroni disponibili presso il PSI (normalmente NADP⁺).

$$\text{- Quenching fotochimico} = \text{PQ} = (F'_M - F'_S) / (F'_M - F'_0)$$

Il quenching fotochimico è connesso allo stato di ossidoriduzione di Q_A nel PSII. Esso equivale approssimativamente all'ossidazione del PSII, e pertanto esprime il decadimento (quenching) della fluorescenza causato dal potenziale fotochimico. In tal modo PQ dà informazioni sui centri di reazione aperti. Al contrario, l'espressione 1-PQ indica i centri di reazione chiusi.

$$\text{- Quenching non fotochimico} = \text{NPQ} = (F_M - F'_M) / F'_M$$

Il quenching non fotochimico esprime l'estinzione della fluorescenza dovuta a processi non fotochimici, in particolare la dissipazione sotto forma di calore. L'eccesso di eccitazione energetica può essere ridotto attraverso processi di dissipazione termica. Il quenching non fotochimico della fluorescenza della clorofilla è indicativo del livello di dissipazione di energia non radiativa che avviene nel sistema di cattura della luce del PSII. L'importanza di NPQ consiste nel fatto che esso dimostra come il livello di eccitazione energetica dell'antenna può essere regolato, prevenendo così un eccesso di potere riducente della catena di trasporto degli elettroni e quindi provvedendo alla protezione dai danni conseguenti.

4.2.4.5 Analisi dei pigmenti fotosintetici

L'estrazione dei pigmenti fotosintetici è stata eseguita secondo il metodo di Ciompi *et al.* (1997) su campioni fogliari conservati a T = -80 °C. Di tutti quelli conservati, è stato preso a caso un campione di circa 30 mg per ogni foglia; in tal modo per ogni pianta sono state ottenute 5 repliche. I campioni fogliari sono stati omogeneizzati in mortaio con acetone puro

(grado HPLC). L'estratto è stato poi filtrato mediante un filtro satellite da 0,2 µm in PVDF, portato al volume di 2 ml ed immediatamente analizzato.

Il contenuto di clorofilla *a* e *b* e di carotenoidi è stato determinato mediante HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione), registrando i picchi in uscita a $\lambda = 445$ nm. La separazione è stata condotta utilizzando una colonna Dionex (Acclaim 120, C18, Dionex, Sunnyvale, California, USA) la cui fase mobile è costituita da due soluzioni: acetonitrile/metanolo 75/25 v/v (soluzione A) e metanolo/acetilato 68/32 v/v (soluzione B). Il programma di eluizione prevede 12 minuti in 100% della soluzione A, 3 minuti in gradiente da 100% di soluzione A a 100% di soluzione B, 15 minuti in 100% di soluzione B ed infine 2 minuti in gradiente da 100% di soluzione B a 100% di soluzione A. Durante la fase di separazione il flusso delle soluzioni è mantenuto a 1 ml min⁻¹ (Thayer & Bjorkman, 1990, modificato). Il riconoscimento degli analiti di interesse è effettuato in corrispondenza dei picchi di massimo assorbimento, per confronto dei tempi di ritenzione degli spettri UV con gli standard relativi. La quantificazione dei pigmenti è stata effettuata in base a rette di calibrazione costruite per ogni standard utilizzato (clorofilla *a* e *b*, zeaxantina, β-carotene). La quantificazione di violaxantina e anteraxantina è stata ottenuta dalla retta di calibrazione della zeaxantina. L'indice di deossidazione (DEPS) è stato calcolato in base alla formula:

$$[(A/2)+Z]/(V+A+Z)$$

Le concentrazioni dei pigmenti sono state espresse come microgrammi per milligrammo di peso fresco di foglia [µg mg⁻¹].

4.2.4.6 Analisi dei carboidrati

L'analisi dei carboidrati è stata effettuata secondo il metodo descritto da (Keutgen *et al.*, 2005), apportando opportune modifiche. Il materiale vegetale (campioni fogliari di 300 mg, conservati a -80 °C) è stato macinato in mortaio con azoto liquido ed omogeneizzato con 5 ml di acqua per HPLC e posto a bagnomaria per 60 minuti a 60 °C. Successivamente l'omogenato è stato centrifugato a 5.000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato recuperato per l'analisi di glucosio, saccarosio e fruttosio (zuccheri non strutturali). Il residuo (pellet) è stato utilizzato per l'estrazione e l'analisi dell'amido. A questa frazione sono stati aggiunti 4 ml di acqua demineralizzata; i campioni quindi sono stati messi per 2 ore a 100 °C a bagnomaria. Successivamente sono stati aggiunti 4 ml di tampone acetato (1,2 M, pH 3,8) e 0,00175 unità dell'enzima amiloglucosidasi (Sigma-Aldrich S.r.l., Milano, Italia) da *Aspergillus niger*, 300 unità ml⁻¹, (enzima che idrolizza l'ultimo legame glicosidico della catena di amido formando glucosio) per consentire la trasformazione dell'amido in glucosio, che avviene nel corso delle 20 ore di incubazione a 60 °C. La determinazione dei

carboidrati è stata effettuata iniettando 20 µl di campione in un sistema HPLC utilizzando una colonna per la separazione 300 x 8 mm Sugar SC1011. Gli zuccheri eluiti vengono riconosciuti da un detector a indice refrattometrico (LC 30-R1, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) a 35 °C. La temperatura della colonna è stata mantenuta a 80 °C e la fase mobile era costituita da acqua per HPLC con un flusso di 1 ml min⁻¹.

Il riconoscimento degli analiti di interesse è stato effettuato in corrispondenza dei picchi di massimo assorbimento, per confronto dei tempi di ritenzione con gli standard relativi.

La somma di glucosio, fruttosio e saccarosio è stata considerata come misura dei carboidrati solubili e la somma dei carboidrati solubili e dell'amido come contenuto di carboidrati totale. Le concentrazioni dei carboidrati sono state espresse come microgrammi per grammo di peso fresco di foglia [µg g⁻¹].

4.2.4.7 Ibridazione sottrattiva soppressiva (PCR-Select)

Preparazione del materiale di partenza per la PCR

a) Estrazione, purificazione e quantificazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale dalle foglie di *V. lantana* è stata effettuata seguendo il metodo descritto da Gambino *et al.* (2008), apportando opportune modifiche. Campioni fogliari di 150 mg, conservati a -80 °C, sono stati macinati in mortaio con azoto liquido. Alla polvere così ottenuta sono stati aggiunti 5 ml di buffer di estrazione [CTAB 2% (w/v), 2 M di NaCl, 100 mM di Tris-HCl, pH 8, 25 mM di EDTA e PVP 2,5% (w/v)]. La miscela è stata messa in agitazione per 10' a 65 °C. In seguito, sono stati aggiunti 5 ml di cloroformio-isoamilalcol [24:1 (v/v)], così da favorire l'eliminazione delle proteine cellulari, che vengono inglobate in una fase gelatinosa che si forma all'interfase tra cloroformio e acqua. Il lisato cellulare è stato posto in centrifuga a 3600 g per 5' a temperatura ambiente. Il surnatante, contenente gli acidi nucleici, è stato recuperato e ad esso è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio-isoamilalcol [24:1 (v/v)]. Dopo aver centrifugato il tutto a 3600 g per 5' a temperatura ambiente e recuperato il surnatante, ad esso è stato aggiunto un ugual volume di LiCl 6 M per precipitare preferenzialmente l'RNA. La sospensione così ottenuta è stata conservata per 30' in ghiaccio. Successivamente, il campione è stato nuovamente centrifugato a 3600 g per 20' (4 °C) ed al pellet sono stati aggiunti 500 µl di SSE buffer [SDS 20% (w/v), 5 M di NaCl, 10 mM di Tris-HCl, pH 8 e 1 mM di EDTA] e 500 µl di cloroformio-isoamilalcol [24:1 (v/v)]. Una volta centrifugato il tutto a 13600 g per 5' (4 °C), al pellet è stato aggiunto 1 ml di isopropanolo. Il tutto è stato conservato per 30' a -20 °C per precipitare gli acidi nucleici. Per purificare l'RNA dal DNA residuo, il campione è stato nuovamente centrifugato a 13600 g

per 20' (4 °C) ed il pellet è stato lavato con 5 ml di etanolo (75%) e centrifugato a 13600 g per 5' (4 °C). Una volta eliminato l'etanolo al 70%, il pellet è stato, nuovamente, lavato con 5 ml di etanolo (100%) e, successivamente, centrifugato a 13600 g per 5' (4 °C). L'RNA, dopo essere stato lasciato ad asciugare a temperatura ambiente per circa 30', è stato solubilizzato in 1 ml di acqua DEPC (DiEtilPiroCarbonato). La quantificazione dell'RNA è stata effettuata misurando l'assorbanza a 230, 260 e 280 nm in cuvette al quarzo in cui è stato posto 1 ml di soluzione ottenuta portando a volume 5 µl del campione proveniente dall'estrazione dell'RNA totale con H₂O distillata. Ogni unità di assorbanza letta a 260 nm equivale a una concentrazione di 40 µg ml⁻¹ in RNA, mentre l'assorbanza a 230 nm indica la contaminazione di sali e di etanolo e quella a 280 nm la contaminazione proteica: dal rapporto tra le coppie di valori misurati (A260/A230 e A260/A280) si ottiene un indice di qualità dell'RNA estratto che, per essere altamente puro, deve avere un valore compreso tra 1,8 e 2,0. Il controllo della qualità del solo RNA estratto è stato effettuato inoltre mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,5%, w/v) in TAE 0,5X. Gli acidi nucleici sono stati visualizzati alla luce ultravioletta (312 nm), mediante legame con bromuro di etidio (10 mg ml⁻¹), dopo una corsa di 30' applicando una differenza di potenziale di 50 V. I parametri considerati per la valutazione sono stati:

- presenza delle bande di RNA,
- separazione dell'RNA in due bande principali di diversa dimensione (RNA ribosomale 28S e 18S),
- integrità dell'RNA (assenza di degradazione, visualizzabile sul gel come smear).

b) Purificazione dell'RNA messaggero (mRNA)

L'isolamento dell'mRNA dall'RNA totale è stato effettuato utilizzando il kit di purificazione *Absolutely mRNA Purification Kit* (Agilent Technologies Italia S.p.A., Cernusco sul Naviglio, MI, Italia) che prevede le seguenti fasi (Figura 4.3):

- immobilizzazione dell'mRNA: sfere magnetiche sono aggiunte alla soluzione di RNA totale così da far ibridare le code di poli(A) che ciascun mRNA contiene, con gli oligonucleotidi [costituiti interamente da residui di desossitimina (dT)] presenti sulle superfici delle microparticelle;
- rimozione di contaminanti: si applica un campo magnetico allo scopo di isolare il complesso mRNA-microparticelle dalla restante soluzione, che si elimina;

- eluizione dell'mRNA: dopo un abbondante lavaggio con una soluzione tampone a bassa forza ionica, gli ibridi mRNA-microparticelle si dissociano e l'mRNA purificato viene eluito in soluzione acquosa.

La quantificazione dell'mRNA è stata effettuata misurando l'assorbanza a 230, 260 e 280 nm in cuvette al quarzo in cui è stato posto 1 ml di soluzione ottenuta portando a volume 5 μ l del campione, proveniente dalla purificazione dell'mRNA a partire dall'RNA totale, con H₂O distillata (come sopra).

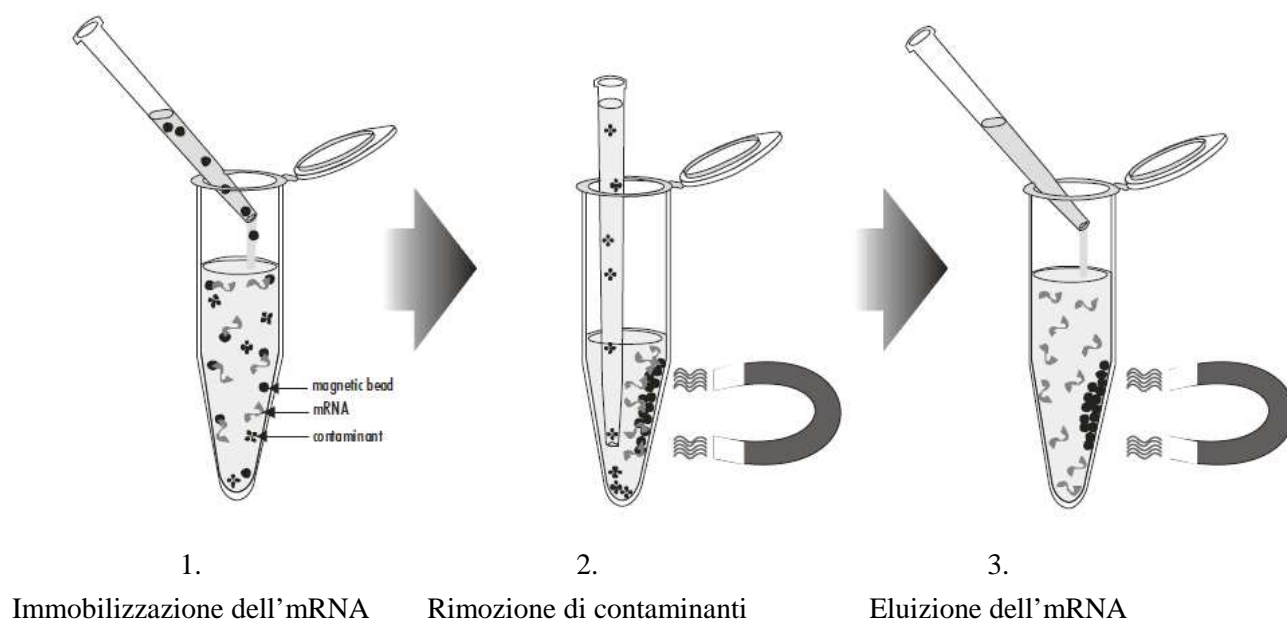


Figura 4.3. Fasi principali del metodo per la purificazione dell'mRNA (da: Absolutely mRNA Purification Kit, Agilent Technologies).

PCR-select

L'approccio di ibridazione sottrattiva, applicato per verificare i geni differenzialmente espressi dalle due popolazioni di piante di viburno (trattato con ozono e controllo), è stato realizzato utilizzando il kit *PCR-SelectTM cDNA subtraction kit* (Clontech, Mountain View, CA, USA). Sono stati eseguiti i seguenti passaggi, schematizzati in Figura 4.4.

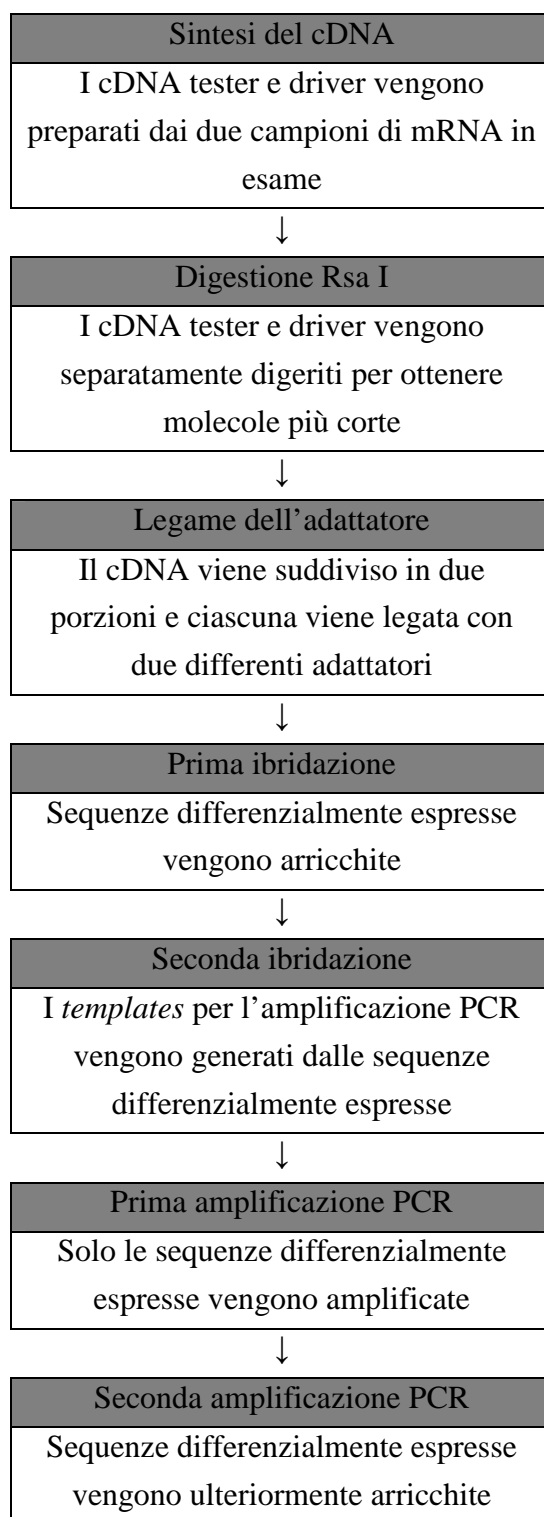


Figura 4.4. Sintesi delle procedure della PCR-Select. Il cDNA nel quale vanno ricercati specifici trascritti è definito come “tester” ed il cDNA di riferimento come “driver”.

- Retrotrascrizione da mRNA a cDNA per le due popolazioni: questa fase è stata realizzata mescolando 4 µl di mRNA con 1 µl di cDNA synthesis primer (10 µM). I campioni sono stati incubati per 2' a 70 °C e successivamente per 2' in ghiaccio; alla miscela così ottenuta sono stati poi addizionati 1 µl di dNTP mix 10 mM, 1 µl di H₂O sterile, 1 µl di 5x First strand buffer e 1 µl di trascrittasi inversa AMV (20 unità µl⁻¹). Dopo aver agitato e incubato per 90' a 42 °C, la reazione è stata inattivata mettendo il tutto in ghiaccio. È stata quindi effettuata la sintesi della seconda catena di cDNA (complementare alla prima): ai campioni di cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione sono stati aggiunti 1,6 µl di dNTP mix 10 mM, 48,4 µl di H₂O sterile, 16 µl di 5x Second strand buffer e 4 µl di Second-Strand Enzyme Cocktail (20X). Dopo aver agitato e incubato il tutto per 60' a 16 °C, sono stati aggiunti 2 µl di T4 DNA polimerasi. Dopo un'incubazione di 30' a 16 °C, sono stati addizionati 4 µl di EDTA/ glicogeno e 100 µl di una miscela fenolo:cloroformio:isoamilalcolool [25:24:1 (v/v)]. Una volta centrifugata la miscela a 13600 g per 10' (18 °C), sono stati aggiunti 100 µl di cloroformio:isoamilalcolool [24:1 (v/v)], 40 µl di acetato di ammonio 4M e 300 µl di etanolo (95%). Il campione è stato nuovamente centrifugato a 13600 g per 20' (18 °C) ed il pellet è stato lavato con 500 µl di etanolo (80%) e centrifugato per 10' (18 °C). Una volta eliminato l'etanolo all'80%, il pellet, dopo essere stato lasciato ad asciugare a temperatura ambiente per circa 10', è stato solubilizzato in 50 µl di acqua DEPC. I campioni di cDNA a doppia elica sono stati conservati a -20 °C;
- Digestione del cDNA per generare piccoli frammenti con estremità smussate: a 43,5 µl di ciascun campione di cDNA sono stati aggiunti 5 µl di tampone di restrizione Rsa I 10X e 1,5 µl di endonucleasi Rsa I (10 unità/µl). Dopo aver miscelato e centrifugato brevemente, i campioni sono stati incubati a 37 °C per 1,5 h e quindi vi sono stati aggiunti 2,5 µl di miscela EDTA10X/glicogeno per terminare la reazione. Dopo l'aggiunta di 50 µl di miscela di fenolo:cloroformio:isoamilalcolool 25:24:1, i campioni sono stati vorticati e centrifugati a 14.000 rpm per 10' per separare le fasi. Lo strato acquoso superiore è stato quindi recuperato ed è stato fatto un altro passaggio nella miscela di alcoli. Sono stati aggiunti quindi 25 µl di NH₄OAc 4 M e 187,5 µl di etanolo 80 %, vorticati e centrifugati 14.000 rpm per 10'. I pellets sono stati quindi coperti con 200 µl di etanolo 80% e centrifugati a 14.000 rpm per 10'. Dopo aver eliminato il surnatante, i pellet sono stati lasciati asciugare all'aria per 5-10' e quindi sciolti in 5,5 µl di acqua e conservati a -20 °C;

- Legame dell'adattatore: ogni cDNA deve essere legato a due diversi adattatori (1 e 2R). A 2 µl di cDNA sono stati aggiunti 2 µl di adattatore, 3 µl di acqua sterile, 2 µl di Ligation buffer 5X e 1 µl di DNA ligasi T4 (400 unità/µl) e dopo una breve centrifuga la miscela è stata incubata a 16 °C tutta la notte. Al mattino è stato aggiunto 1 µl di miscela EDTA/glicogeno per bloccare la reazione;
- Ibridazione del cDNA: la prima ibridazione è stata realizzata mescolando 1,5 µl di Rsa-I digested Driver cDNA (O₃ o C), 1 µl di 4X Hybridization buffer a 1,5 µl di Adaptor 1-ligated Tester (C11 e O₃11) o 1,5 µl di Adaptor 2R-ligated Tester (C12 e O₃12). I campioni sono stati incubati a 98 °C per 1,5' e successivamente a 68 °C per 8 h. Nella seconda ibridazione del cDNA, i due campioni della prima ibridazione vengono mescolati (C11O₃+C12O₃; O₃11C+O₃12C) e viene aggiunto nuovo cDNA non legato all'adattatore dell'altra popolazione (O₃ in C11O₃+C12O₃ e C in O₃11C+O₃12C): questo è stato effettuato preparando 1 µl di Driver cDNA, 1 µl di Hybridization buffer 4X e 2 µl di H₂O sterile e dopo incubazione a 98 °C per 2' mescolati con i prodotti della prima ibridazione. Dopo un'incubazione per tutta la notte a 68 °C, sono stati aggiunti 200 µl di tampone di diluizione, mescolati e la reazione è stata inattivata mettendo il tutto a 68 °C per 7'; i campioni sono stati quindi conservati a -20 °C;
- Amplificazione del cDNA delle due popolazioni precedentemente ibridato: la I amplificazione è stata realizzata aggiungendo ad 1 µl di cDNA di ogni campione 19,5 µl di H₂O sterile, 2,5 µl di 10X PCR reaction buffer, 0,5 µl di dNTP mix (10 mM), 1 µl di PCR Primer 1 (10 µM) e 0,5 µl di 50X Advantage cDNA Polymerase Mix. La miscela è stata sottoposta a PCR, il cui programma d'amplificazione è schematizzato in Tabella 4.2.

Tabella 4.2. Schema riassuntivo del primo programma di amplificazione utilizzato per l'analisi molecolare di foglie di *V. lantana*.

		Temperatura	Durata
Estensione degli adattatori		75 °C	5'
27 cicli	Denaturazione	94 °C	30''
	Appaiamento primer	66 °C	30''
	Estensione	72 °C	1' 30''

Per la II amplificazione, ad 1 µl di prodotto della I PCR diluito 1:10 in H₂O sterile sono stati aggiunti 18,5 µl di H₂O sterile, 2,5 µl di 10X PCR reaction buffer, 0,5 µl di dNTP mix (10 mM), 1 µl di Nested PCR Primer 1 (10 mM), 1 µl di Nested PCR Primer 2R (10 mM) e 0,5 µl di 50X Advantage cDNA Polymerase Mix. La miscela è stata sottoposta a PCR, il cui programma d'amplificazione è schematizzato in Tabella 4.3.

Tabella 4.3. Schema riassuntivo del secondo programma di amplificazione utilizzato per l'analisi molecolare di foglie di *V. lantana*.

		<i>Temperatura</i>	<i>Durata</i>
10 cicli	Denaturazione	94 °C	30''
	Appaiamento primer	68 °C	30''
	Estensione	72 °C	1' 30''

I prodotti della PCR sono stati analizzati, caricandoli su gel di agarosio (1,5%, w/v) in TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA), utilizzando 45 µl di campione e 2 µl di loading buffer. È stata, quindi, applicata una differenza di potenziale di 100 V per 20'. Il gel è stato, poi, illuminato con un transilluminatore e le bande evidenziate sono state confrontate con quelle di riferimento (Step Ladder 50 bp, Sigma).

4.2.5 Analisi dei dati

Le piante assegnate a Trattamento e Controllo e quelle che, alle diverse date, sono state di volta in volta prelevate dalla sperimentazione per effettuare le analisi biochimiche, sono state tutte selezionate secondo criterio random.

I dati risultanti dalle analisi morfologiche, fisiologiche e biochimiche sono stati mediati, per ogni tempo, a livello di pianta.

La valutazione degli effetti del trattamento con O₃ è stata eseguita tramite ANOVA a due vie, considerando i fattori "ozono" e "tempo di esposizione". Dove l'interazione "ozono x tempo di esposizione" è risultata significativa, una comparazione delle medie a posteriori è stata svolta applicando il test Bonferroni al livello di significatività $P \leq 0,05$.

Prima di procedere con le analisi è stata verificata la normalità della distribuzione dei dati con il test di Kolmogorov-Smirnov; quando necessario, si è proceduto alla trasformazione Box-Cox dei dati.

Per quanto riguarda i dati di fluorescenza modulata della clorofilla a, poiché le misure sono state eseguite solo in due tempi (T=0 e 30 giorni), le differenze tra le medie delle piante di controllo e di quelle sottoposte a trattamento con ozono sono state testate per la loro significatività con il t-test di Student.

Tutte le analisi statistiche sono state elaborate con il programma Statistica 7.1 (Statsoft 2006, Tulsa, OK, USA).

4.3 Risultati

4.3.1 Sintomi fogliari

Le piante di *V. lantana* trattate con ozono hanno sviluppato i tipici sintomi fogliari, che consistono in lesioni necrotiche puntiformi (stipples) localizzate nelle regioni internervali della superficie adassiale della lamina fogliare (Figura 4.4). I sintomi sono stati confermati attraverso analisi microscopica di sezioni del mesofillo fogliare. Ciò costituisce ulteriore conferma di quanto osservato in campo su piante spontanee.

Dopo 15 giorni dall'inizio della sperimentazione, una sola pianta trattata con ozono risultava sintomatica, anche se i sintomi rilevati non interessavano le foglie identificate per l'attribuzione della percentuale di superficie danneggiata.

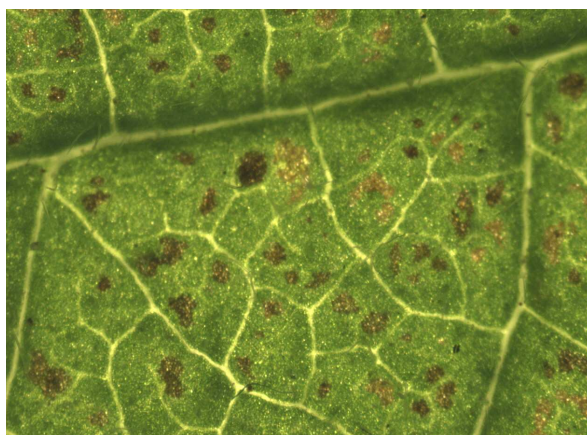


Figura 4.4. Sintomi fogliari su *V. lantana* dopo 15 gg di trattamento con ozono (60 ppb, 5 h d⁻¹).

L'andamento temporale della percentuale media di superficie fogliare sintomatica (riferita alle 5 foglie osservate per ciascuna pianta) è riportato in Figura 4.5. A 45 giorni dall'inizio della sperimentazione, la percentuale di superficie fogliare sintomatica media delle piante trattate ha raggiunto circa il 15%. Alla fine della prova anche piante di controllo presentavano lievi sintomi ascrivibili all'ozono: una possibile spiegazione può essere individuata nell'esposizione accidentale delle piante all'ozono presente nell'aria ambiente durante fasi di

acquisizione dei dati di fluorescenza, misurazioni che per motivi pratici venivano svolte al di fuori della cella climatica; considerato il periodo di realizzazione della sperimentazione (luglio – agosto) è plausibile che nell'aria ambiente fossero presenti livelli di ozono tali da provocare danno alle piante, anche se esposte per brevi periodi.

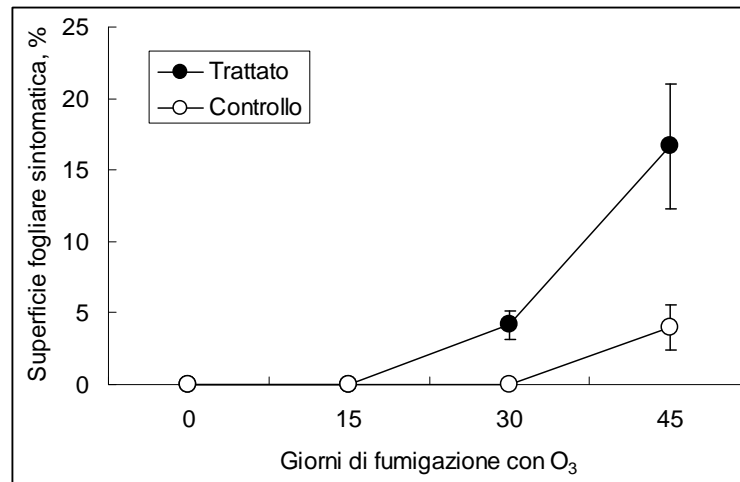


Figura 4.5. Andamento temporale della percentuale media di superficie fogliare sintomatica nel trattato e controllo (le barre rappresentano l'errore standard).

4.3.2 Contenuto di clorofilla e fluorescenza diretta della clorofilla a

In Figura 4.6a è rappresentato il contenuto medio di clorofilla riscontrato nelle piante trattate con ozono e in quelle di controllo; in Figura 4.6b gli stessi dati sono rappresentati in modo relativizzato $[(\text{Trattato}/\text{Controllo})-1]$, per mettere in maggior evidenza le differenze. Nelle piante di controllo si osserva un tendenziale incremento nel tempo del contenuto di clorofilla; tale incremento, anche se meno marcato, è osservabile inizialmente anche nelle piante trattate, ma dopo 30 giorni di trattamento il contenuto medio decresce rapidamente. Dopo 45 giorni di fumigazione con ozono, il contenuto medio di clorofilla è circa il 20% in meno rispetto alle piante di controllo.

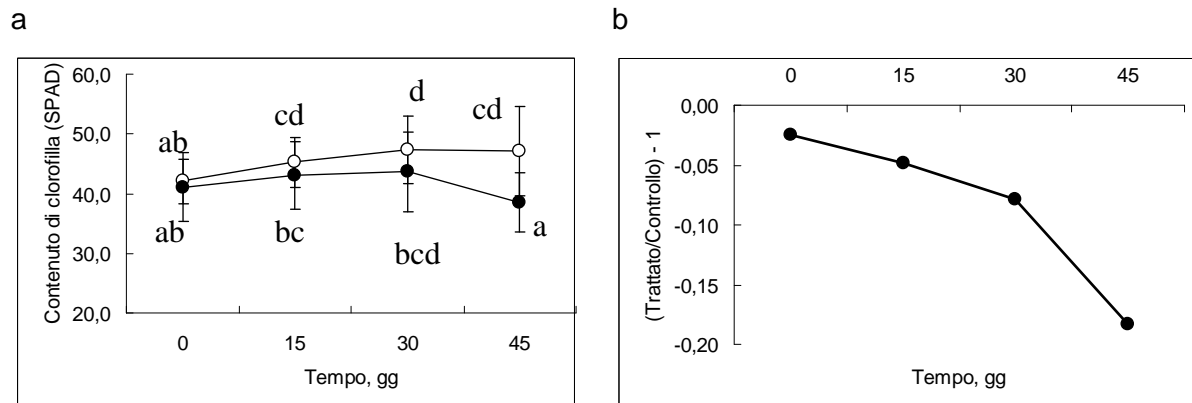


Figura 4.6. a): andamento temporale dei valori medi (\pm deviazione standard) del contenuto fogliare di clorofilla misurato con il clorofillometro SPAD sulle piante di *V. lantana* del Controllo (simbolo vuoto) e del Trattato (simbolo pieno); b): valori di clorofilla relativizzati [(Trattato / Controllo) - 1].

In tabella 4.4.a è riportato il risultato della statistica ANOVA, realizzata al fine di valutare gli effetti del trattamento con ozono, del tempo di esposizione all'inquinante e dell'interazione tra i due fattori sul contenuto fogliare di clorofilla misurato con la tecnica non distruttiva SPAD. Entrambi i fattori e la loro interazione sono risultati significativi.

In Tabella 4.5 sono riportati i valori medi (\pm deviazione standard) per data e trattamento dei parametri del JIP-test considerati per il presente studio. In Figura 4.7 gli stessi parametri sono rappresentati in termini relativi [(Trattato/Controllo) - 1]. Da tali grafici si nota che, a 15 giorni dall'inizio del trattamento, la fluorescenza minima (F_0) relativa delle piante trattate con ozono tende ad aumentare; i parametri W_{OK100} e W_{OJ300} aumentano dopo 30 giorni di fumigazione. La fluorescenza massima (F_M) mostra un'evidente diminuzione nelle piante trattate a partire da 30 giorni dall'inizio del trattamento con ozono. L'ampiezza della fase I-P (ΔV_{I-P}) ed il Performance Index presentano una diminuzione relativa dopo 15 giorni dall'inizio della sperimentazione. L'efficienza massima della fotochimica primaria (ϕ_{P0} o F_V/F_M) e ψ_0 mostrano una diminuzione dei valori relativi fin dall'inizio del trattamento con ozono.

Tabella 4.5. Valori medi (\pm deviazione standard) dei principali parametri del JIP-test ottenuti dai transienti di fluorescenza registrati con il fluorimetro HandyPEA al tempo zero e dopo 15, 30 e 45 giorni di fumigazione con ozono.

	Giorni di trattamento	Controllo			Trattato		
		media		ds	media		ds
F_0	0	745,911	\pm	44,807	756,778	\pm	58,462
	15	752,651	\pm	42,153	758,489	\pm	74,467
	30	704,533	\pm	44,856	756,233	\pm	76,313
	45	757,600	\pm	57,949	860,400	\pm	66,880
F_M	0	3509,511	\pm	176,656	3606,956	\pm	211,643
	15	3612,651	\pm	155,993	3554,222	\pm	236,021
	30	3347,567	\pm	275,077	3381,767	\pm	251,053
	45	3611,667	\pm	239,501	3339,533	\pm	321,317
ϕP_0	0	0,823	\pm	0,014	0,827	\pm	0,011
	15	0,825	\pm	0,009	0,823	\pm	0,008
	30	0,821	\pm	0,014	0,815	\pm	0,014
	45	0,824	\pm	0,016	0,786	\pm	0,023
$W_{ok_{100}}$	0	0,223	\pm	0,017	0,223	\pm	0,014
	15	0,213	\pm	0,012	0,216	\pm	0,016
	30	0,227	\pm	0,013	0,230	\pm	0,021
	45	0,214	\pm	0,017	0,239	\pm	0,021
W_{300}	0	0,433	\pm	0,027	0,434	\pm	0,033
	15	0,416	\pm	0,023	0,426	\pm	0,031
	30	0,444	\pm	0,023	0,460	\pm	0,042
	45	0,421	\pm	0,037	0,479	\pm	0,036
ψ_0	0	0,547	\pm	0,057	0,536	\pm	0,061
	15	0,566	\pm	0,103	0,535	\pm	0,047
	30	0,603	\pm	0,046	0,535	\pm	0,040
	45	0,533	\pm	0,042	0,471	\pm	0,039
ΔV_{I-P}	0	0,157	\pm	0,025	0,157	\pm	0,035
	15	0,155	\pm	0,031	0,155	\pm	0,039
	30	0,183	\pm	0,053	0,138	\pm	0,038
	45	0,148	\pm	0,033	0,121	\pm	0,028
PI_{TOT}	0	8,729	\pm	2,845	9,048	\pm	4,367
	15	9,051	\pm	3,201	8,780	\pm	4,557
	30	11,797	\pm	5,367	6,508	\pm	3,385
	45	8,706	\pm	4,145	3,668	\pm	1,719

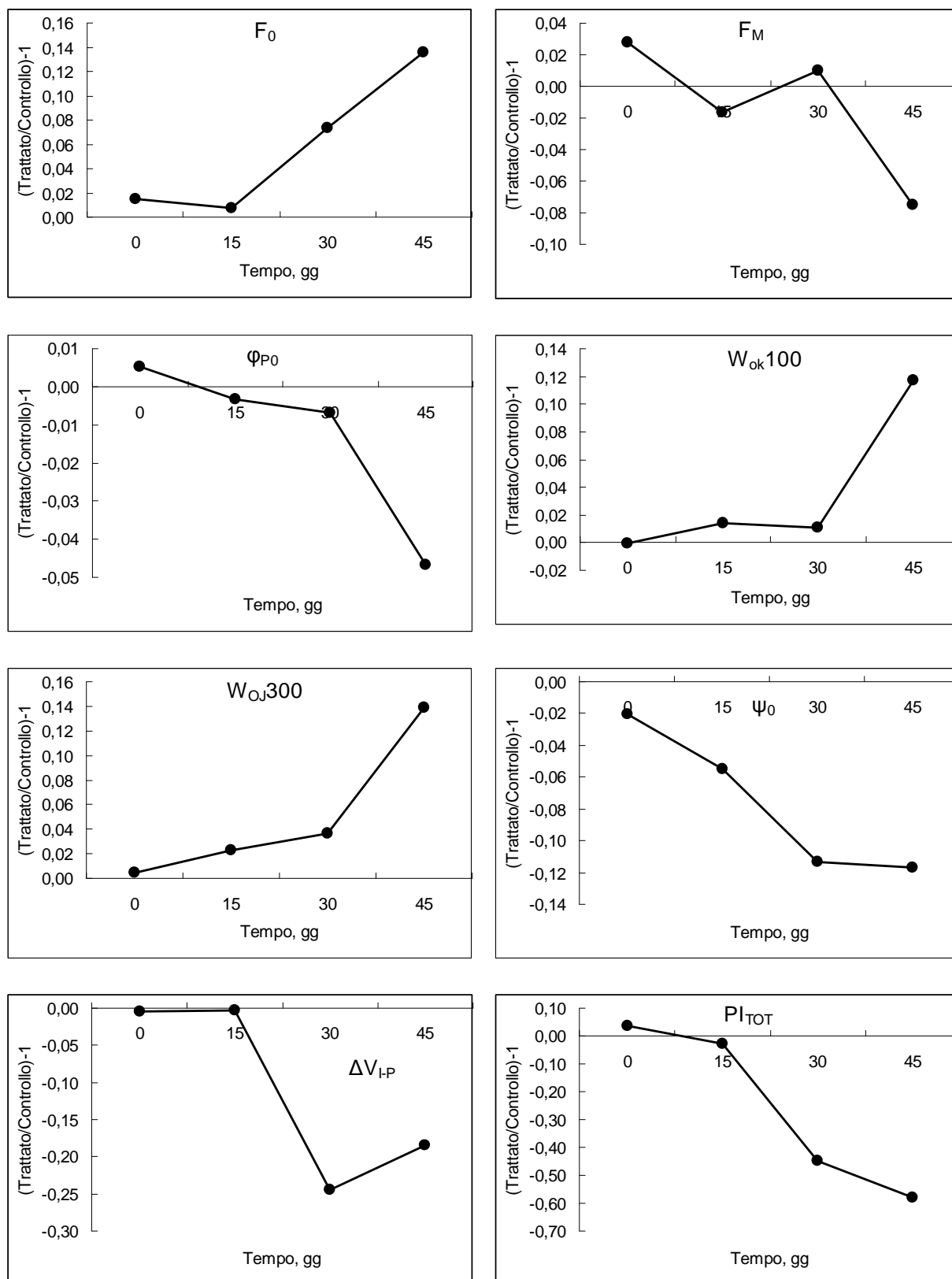


Figura 4.7. Andamento temporale dei parametri del JIP-test relativizzati [(trattato/controllo)-1].

In Tabella 4.4b sono riportati i risultati della statistica ANOVA, realizzata al fine di valutare gli effetti del trattamento con ozono, del tempo di esposizione all'inquinante e dell'interazione tra i due fattori sulla risposta fotosintetica delle piante. Tutti i fattori sono risultati influire in maniera significativa sui parametri di fluorescenza, tranne il trattamento con ozono sulla fluorescenza massima (F_M).

Per i parametri che sembrano “rispondere” al trattamento con ozono in maniera più tempestiva, sono stati effettuati dei confronti *post-hoc* per mettere in evidenza le differenze significative tra i singoli valori; i risultati sono rappresentati in Figura 4.8. L'efficienza massima della fotochimica primaria resta invariata nelle piante di controllo per tutto il periodo della sperimentazione; nelle piante trattate con ozono il valore di questo parametro diventa significativamente inferiore - rispetto al controllo e rispetto ai valori del trattato delle settimane precedenti - dopo 30 giorni di fumigazione con ozono. Per il Performance Index e per ψ_0 le differenze tra Trattato e Controllo diventano significative dopo 15 giorni di trattamento.

Tabella 4.4. Effetti del trattamento di ozono (Trattamento), del tempo di esposizione (Tempo) e della loro interazione (Trattamento * Tempo) su: a) contenuto di clorofilla SPAD; b) parametri di fluorescenza diretta della clorofilla *a*; c) contenuto fogliare di pigmenti fotosintetici; d) contenuto fogliare di carboidrati in piante di *V. lantana* esposte a ozono (60 ppb, 5 h d⁻¹ per 45 giorni consecutivi). I valori numerici in tabella rappresentano F. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative per: * = P≤0,001; ** = P≤0,01; * = P≤0,05; ns = P>0,05.**

	Trattamento		Tempo		Trattamento x Tempo	
	F		F		F	
a) Chl (SPAD)	33,87	***	7,34	***	3,70	**
b) Fluorescenza diretta						
F ₀	23,95	***	11,23	***	5,99	***
F _M	2,00	ns	12,02	***	5,76	***
Φ _{P0}	37,79	***	19,32	***	20,82	***
PI _{TOT}	35,19	***	7,78	***	9,73	***
W ₃₀₀	22,47	***	13,82	***	6,08	***
W _{OK100}	11,07	**	10,57	***	4,62	**
ΔV _{L-P}	16,36	***	4,13	**	5,46	**
Ψ ₀	31,13	***	11,84	***	5,36	**
c) Pigmenti fotosintetici						
Chl (<i>a+b</i>)	2,63	ns	17,95	***	1,11	ns
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	4,17	**	47,45	***	0,98	ns
Carotenoidi totali	7,90	**	3,36	***	8,65	*
Chl(<i>a+b</i>)/Carot. tot.	6,34	**	3,88	*	8,89	***
VAZ	8,50	**	3,08	*	0,73	***
DEPS	9,43	**	27,87	ns	3,62	ns
d) Carboidrati						
Saccarosio	2,56	ns	2,64	ns	1,20	ns
Glucosio	6,89	**	1,88	ns	3,82	**
Fruttosio	3,71	ns	0,25	ns	3,04	ns
Amido	1,10	ns	12,17	***	0,49	ns
Carboidrati totali	6,44	**	0,24	ns	2,33	ns

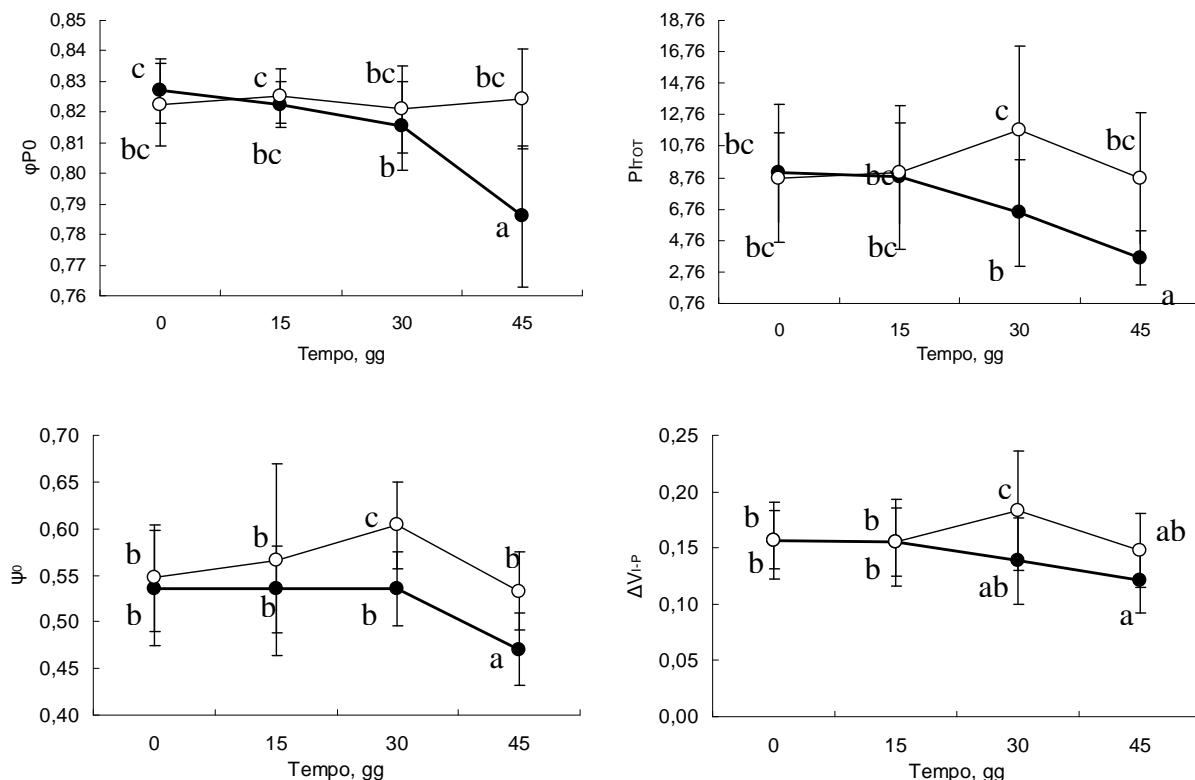


Figura 4.8. Andamento temporale di parametri del JIP-test (media \pm deviazione standard) misurati su piante di *V. lantana* esposte ad ozono (60 ppb per 45 giorni consecutivi, 5 ore al giorno) (●) e in piante di controllo mantenute in aria filtrata (○). Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ($P \leq 0,05$) in base all'ANOVA a due vie (vedi Tab. 4.4b) seguita da test Bonferroni.

In Figura 4.9a si riportano le curve medie dei transient di fluorescenza registrati in diversi momenti della sperimentazione. Si nota, con il passare del tempo, un progressivo aumento della fluorescenza minima (F_0) delle piante trattate con ozono rispetto a quelle di controllo; la fluorescenza massima (F_M) mostra un comportamento contrario, risultando al termine della prova inferiore per le piante trattate rispetto a quelle di controllo.

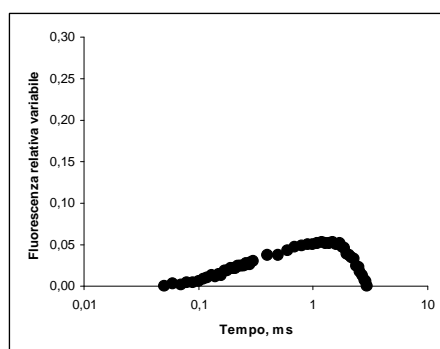
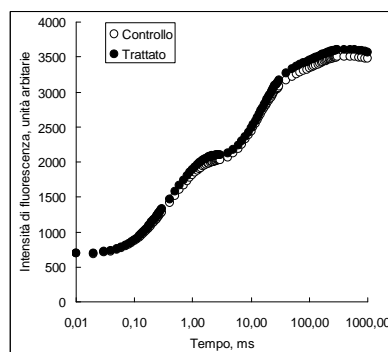
Le curve ΔW (Figura 4.9b) ottenute per sottrazione dei transient di fluorescenza normalizzati tra F_0 (0,05 ms) e F_J (2 ms) mostrano un andamento sempre più marcato con il passare del tempo, indicando una crescente perdita di efficienza dell'*Oxygen Evolving System* delle piante trattate con ozono rispetto a quelle di controllo.

Giorni di
fumigazione

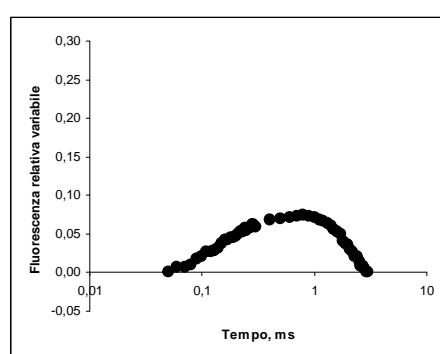
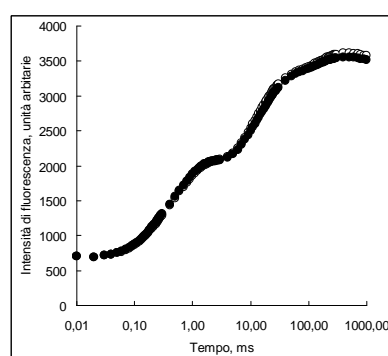
a) *Transient* di fluorescenza

b) $\Delta W = W_{\text{Trattato}} - W_{\text{Controllo}}$

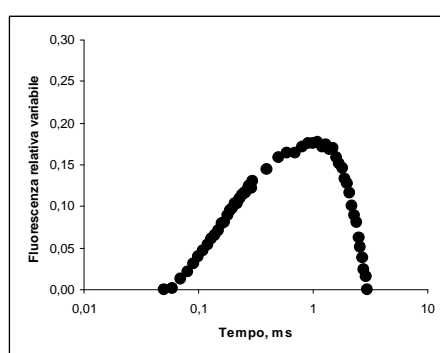
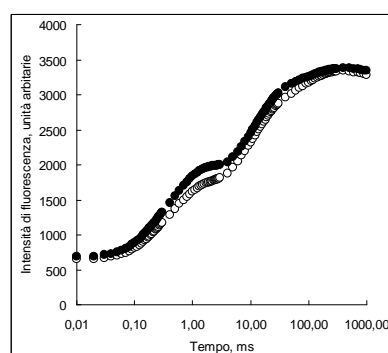
0



15



30



45

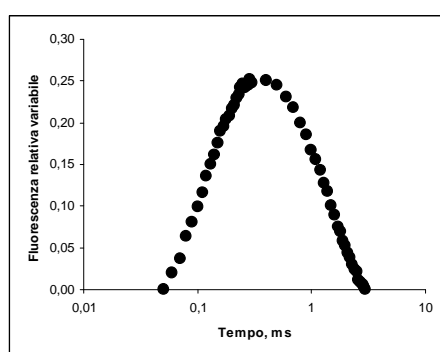
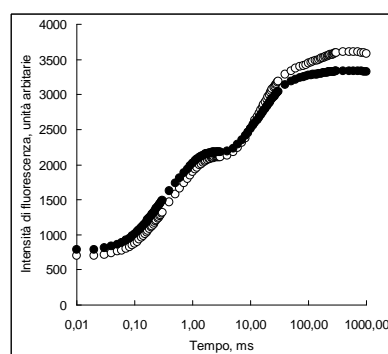


Figura 4.9. Transienti OJIP (a) e curve ΔW (b) ottenute per sottrazione dei *transient* di fluorescenza normalizzati tra F_0 (0,05 ms) e F_J (2 ms) e moltiplicati per 4.

4.3.3 Fluorescenza modulata della clorofilla *a*

La fluorescenza modulata della clorofilla *a* è stata misurata prima dell'inizio della sperimentazione sull'intero pool di piante al fine di caratterizzare la situazione di partenza (Tabella 4.6). Le misure sono state ripetute dopo 30 giorni dall'inizio della fumigazione con ozono, sia sulle piante trattate sia su quelle di controllo (Tabella 4.7). Le differenze tra Trattato e Controllo al tempo T=30 giorni (t-test) sono risultate significative per la fluorescenza basale (F_0), per la massima efficienza del PSII (F_v/F_m) e per la resa quantica effettiva (*Yield*). Benché l'estinzione fotochimica (QP) sia risultata inferiore nel trattato rispetto al controllo, le differenze non sono significative; anche per l'estinzione non fotochimica (NPQ) le differenze non sono significative, anche se - come atteso - il valore era più elevato nel trattato rispetto al controllo.

Tabella 4.6. Valori medi e deviazioni standard dei principali parametri della fluorescenza modulata registrati con il fluorimetro PAM al tempo zero (T0) sull'intero pool di piante destinate alla sperimentazione.

	F_0	F_M	F_v/F_M	Yield	QP	QNP
Media	0,247	0,994	0,745	0,422	0,755	0,705
ds	0,031	0,166	0,054	0,085	0,084	0,075

Tabella 4.7. Valori medi e deviazioni standard dei principali parametri della fluorescenza modulata registrati con il fluorimetro PAM dopo 30 giorni di fumigazione con ozono. La significatività delle differenze tra controllo e trattato (t-test) è indicata con: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,001$.**

Parametro	Controllo			Trattato			
	Media		Ds	Media		ds	
F_0	0,202	±	0,013	0,224	±	0,016	***
F_M	1,035	±	0,088	1,050	±	0,083	ns
F_v/F_M	0,804	±	0,012	0,786	±	0,011	***
Yield	0,341	±	0,076	0,283	±	0,063	*
QP	0,603	±	0,115	0,524	±	0,100	ns
QNP	0,792	±	0,044	0,799	±	0,027	ns

Come già riscontrato attraverso le misure di fluorescenza diretta della clorofilla *a*, anche con la fluorescenza modulata si confermano una fluorescenza minima (F_0) più elevata ed una resa quantica massima (F_v/F_M) inferiori nel trattato rispetto al controllo.

4.3.4 Contenuto fogliare di pigmenti fotosintetici

In Tabella 4.8 sono riportati i dati relativi alle analisi del contenuto fogliare di pigmenti fotosintetici effettuate sulle piante di *V. lantana* prima dell'inizio del trattamento con ozono; in Tabella 4.9 per gli stessi parametri si riportano i valori analizzati dopo 15, 30, 45 giorni di trattamento con ozono, ed i corrispondenti valori riferiti alle piante di controllo. Per l'analisi ANOVA, i cui risultati sono riportati nella Tabella 4.4.c, sono stati considerati i seguenti parametri: il contenuto totale di clorofilla ($a + b$), il rapporto tra clorofilla a e clorofilla b ; il contenuto totale di carotenoidi, il rapporto tra clorofilla totale e carotenoidi totali, la somma di viola-, antra- e zeaxantina, l'indice di de-epossidazione. I valori di tali parametri, registrati prima dell'inizio del trattamento con ozono e ai diversi tempi della sperimentazione nelle piante trattate ed in quelle di controllo, sono riportati in Figura 4.10; con differenti lettere sono evidenziati i valori significativamente diversi (Bonferroni) per quei parametri risultati significativamente influenzati dall'interazione dei fattori "ozono x tempo".

Il contenuto di clorofilla totale ed il rapporto tra clorofilla a e b nel trattato tendono a diminuire nel tempo e sono inferiori al controllo, ma le differenze non sono significative. Anche il livello dei carotenoidi del trattato diminuisce nel tempo, e le differenze sono significative dopo 30 giorni di fumigazione. Il comportamento di VAZ è particolare: i valori del trattato sono significativamente inferiori al controllo a 30 giorni dall'inizio della fumigazione; successivamente aumentano ed a 45 giorni sono significativamente superiori. Per quanto riguarda i valori di DEPS, questi non presentano variazioni significative per nessuno dei fattori analizzati e neppure per la loro interazione, benché siano sempre maggiori nel trattato rispetto al controllo.

Tabella 4.8. Contenuto fogliare medio di pigmenti fotosintetici in piante di *V. lantana* al tempo zero.

	Media	DS
	$\mu\text{g mg}^{-1}$	
Clorofilla a	26,16 \pm	1,363
Clorofilla b	10,44 \pm	0,222
α -Carotene	2,55 \pm	0,354
β -Carotene	8,16 \pm	0,273
Luteina	0,28 \pm	0,005
Neoxantina	0,91 \pm	0,064
Violaxantina	1,48 \pm	0,104
Anteraxantina	0,19 \pm	0,015
Zeaxantina	0,21 \pm	0,006

Tabella 4.9. Contenuto fogliare medio di pigmenti in piante di *V. lantana* dopo 15, 30 e 45 giorni di esposizione ad ozono (60 ppb per 5 ore al giorno).

	Giorni di trattamento	Controllo, $\mu\text{g mg}^{-1}$			Trattato, $\mu\text{g mg}^{-1}$		
		Media		ds	Media		ds
Clorofilla <i>a</i>	15	25,01	±	3,733	23,18	±	3,996
	30	24,14	±	2,585	21,82	±	3,274
	45	17,30	±	3,750	17,13	±	4,507
Clorofilla <i>b</i>	15	11,21	±	1,890	10,36	±	1,946
	30	10,85	±	1,295	10,09	±	1,629
	45	9,12	±	1,857	9,73	±	1,849
α-Carotene	15	2,73	±	0,758	2,80	±	0,973
	30	3,38	±	0,999	2,33	±	0,941
	45	2,76	±	0,864	1,14	±	0,483
β-Carotene	15	7,70	±	2,536	8,08	±	1,282
	30	8,15	±	1,131	6,46	±	1,946
	45	4,82	±	1,858	4,35	±	1,324
Luteina	15	0,29	±	0,054	0,24	±	0,040
	30	0,26	±	0,031	0,26	±	0,033
	45	0,25	±	0,043	0,28	±	0,056
Neoxantina	15	0,92	±	0,224	0,85	±	0,162
	30	0,86	±	0,153	0,86	±	0,160
	45	0,95	±	0,170	0,92	±	0,258
Violaxantina	15	1,41	±	0,272	1,36	±	0,457
	30	1,24	±	0,206	1,11	±	0,301
	45	1,25	±	0,315	1,24	±	0,372
Anteraxantina	15	0,18	±	0,053	0,21	±	0,067
	30	0,18	±	0,042	0,21	±	0,085
	45	0,20	±	0,064	0,24	±	0,094
Zeaxantina	15	0,16	±	0,073	0,15	±	0,033
	30	0,17	±	0,040	0,16	±	0,028
	45	0,10	±	0,047	0,15	±	0,061

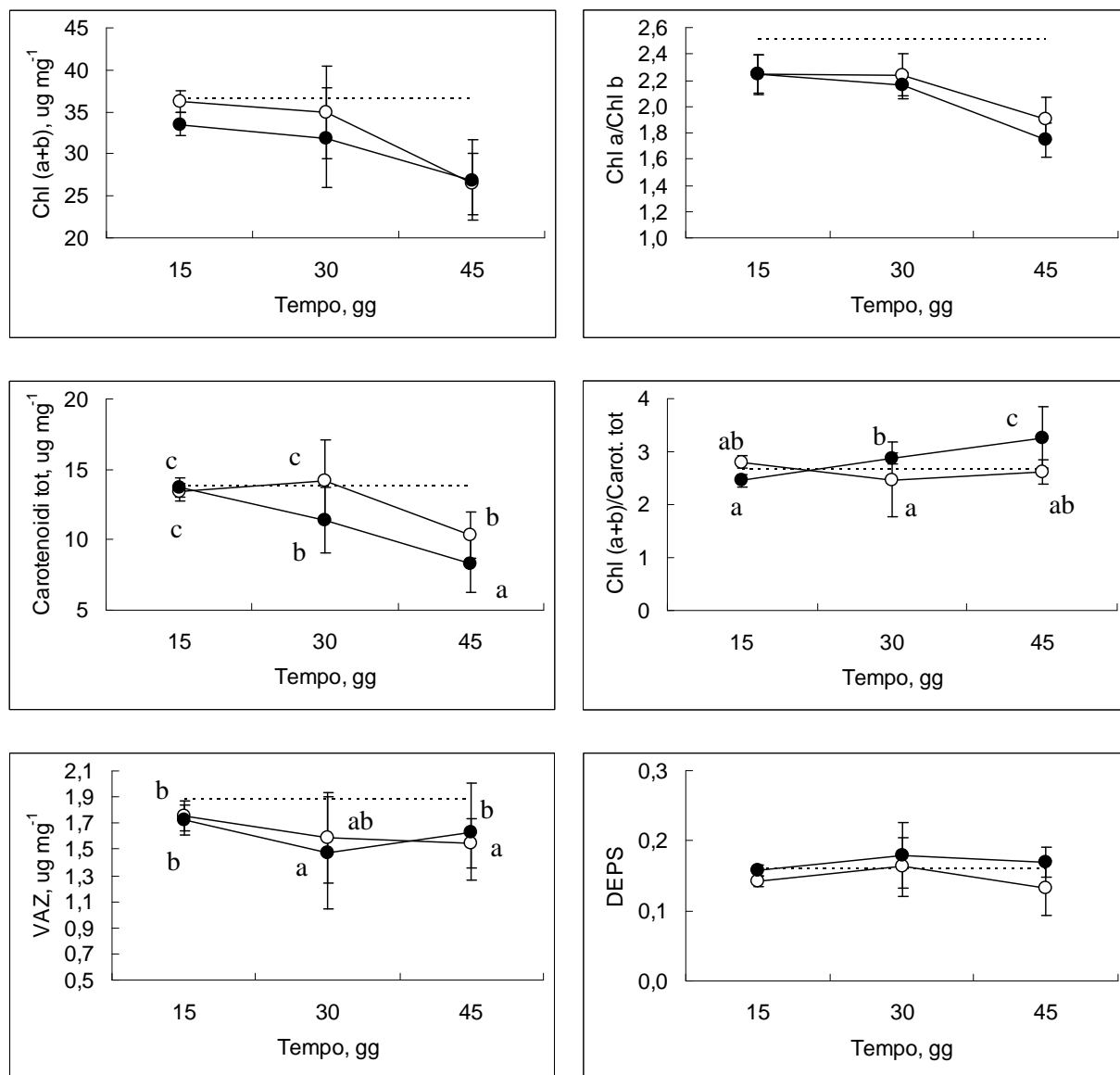


Figura 4.10. Andamento temporale medio (\pm deviazione standard) del contenuto fogliare di pigmenti in piante di *V. lantana* esposte ad ozono (60 ppb per 45 giorni consecutivi, 5 ore al giorno) (●) e in piante di controllo mantenute in aria filtrata (○). Lettere diverse indicano valori significativamente diversi ($P \leq 0,05$) in base all'ANOVA a due vie (vedi Tab. 4.4c) seguita da test Bonferroni. La linea tratteggiata rappresenta il valore medio analizzato al tempo zero.

Abbreviazioni: DEPS = indice di deossidazione; VAZ = violaxantina+anteraxantina+zeaxantina.

4.3.5 Contenuto fogliare di carboidrati

Il contenuto fogliare di carboidrati è riportato in Tabella 4.10. L'analisi ANOVA (Tabella 4.4d) ha evidenziato un effetto significativo del fattore Trattamento (ozono) sul contenuto fogliare di glucosio e dei carboidrati totali. L'interazione dei due fattori (Trattamento x Tempo) è risultata significativa solo per il glucosio (Figura 4.11); il contenuto di questo zucchero nei campioni trattati con ozono è inferiore a quello delle piante di controllo in tutti e tre i tempi analizzati. Purtroppo, per i carboidrati non è stato possibile effettuare l'analisi al tempo zero e quindi non esiste un valore di riferimento, prima dell'inizio del trattamento. Inoltre, i valori di deviazione standard sono quasi sempre piuttosto elevati e questo fa supporre che vi sia stato qualche problema durante le fasi analitiche e/o di conservazione dei campioni.

Tabella 4.10. Contenuto fogliare medio di carboidrati in piante di *V. lantana* dopo 15, 30 e 45 giorni di esposizione ad ozono (60 ppb per 5 ore al giorno).

	Giorni di trattamento	Controllo, $\mu\text{g g}^{-1}$			Trattato, $\mu\text{g g}^{-1}$		
		media		Ds	Media		ds
Saccarosio	15	2807,17	±	650,505	2127,86	±	1165,756
	30	2985,00	±	530,099	3104,13	±	452,775
	45	3365,02	±	1183,838	3254,89	±	481,960
Glucosio	15	1685,03	±	638,016	1275,72	±	664,663
	30	2156,56	±	553,330	2002,55	±	412,520
	45	1811,44	±	771,406	1678,50	±	309,959
Fruttosio	15	905,76	±	517,747	500,77	±	336,483
	30	693,45	±	273,280	773,20	±	340,536
	45	875,62	±	456,045	721,64	±	206,403
Amido	15	1,67	±	0,024	1,62	±	0,155
	30	1,60	±	0,065	1,65	±	0,077
	45	1,77	±	0,137	1,76	±	0,115
Carboidrati solubili	15	5397,96	±	1780,659	3744,88	±	1959,406
	30	5835,01	±	1244,314	5879,88	±	949,657
	45	6052,08	±	2280,046	5655,03	±	971,894
Carboidrati totali	15	5399,22	±	1780,570	3746,10	±	1959,231
	30	5836,32	±	1244,340	5881,53	±	949,690
	45	6053,85	±	2280,059	5656,79	±	971,966

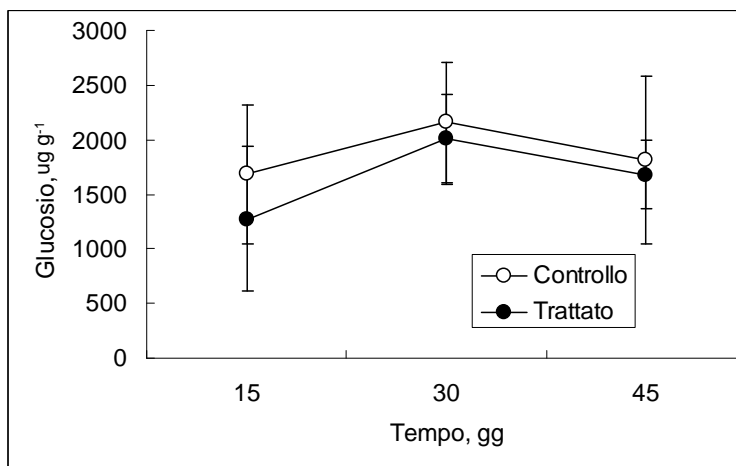


Figura 4.11. Andamento temporale medio del contenuto fogliare di glucosio in piante di *V. lantana* esposte ad ozono (60 ppb per 45 giorni consecutivi, 5 ore al giorno) (●) e in piante di controllo mantenute in aria filtrata (○).

4.3.6 PCR-select

L'isolamento dell'RNA è stato effettuato su foglie di *V. lantana*, prelevate dopo 15 giorni di esposizione all'ozono. La purezza e la concentrazione di RNA totale - isolato da piante trattate e non - sono state valutate determinando l'assorbanza spettrofotometrica dei campioni a 230, 260 e 280 ed i loro rapporti (Tabella 4.12)

Tabella 4.12. RNA totale ($\mu\text{g ml}^{-1}$) isolato da foglie di *V. lantana* al termine dell'esposizione con ozono (60 ppb, 5 h d⁻¹ per 15 giorni consecutivi) (Trattato) a confronto con quello isolato da piante non sottoposte a trattamento (Controllo)

	ABS 280	ABS 260	ABS 230	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230	RNA totale ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Trattato	0,123	0,208	0,074	1,69	2,81	832
Controllo	0,204	0,317	0,115	1,55	2,76	1268

Come è possibile osservare dai rapporti 260/280 e 260/230, la qualità dell'RNA estratto è elevata e, come riportato in Figura 4.12, ne è evidente l'integrità. Infatti, i 10 μg di RNA caricati su un gel di agarosio 1% con bromuro di etidio, mostrano la totale assenza di bande degradate per gli RNA ribosomali 28S e 18S.

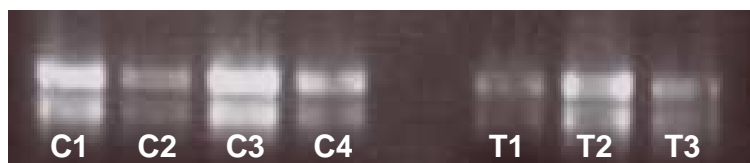


Figura 4.12. Gel di agarosio (1%) colorato con bromuro di etidio e visualizzato sotto luce ultravioletta, su cui sono state fatte correre repliche di RNA totale isolato da foglie di *V. lantana* dopo 15 giorni di esposizione con ozono (60 ppb, 5 h d⁻¹ per 45 giorni consecutivi) (T1-T3) e non sottoposto a trattamento (C1-C4). Il bromuro di etidio permette di visualizzare sul gel le bande di rRNA 28S e 18S, che non mostrano degradazione.

Dall'analisi delle fotografie scattate, infatti, si può affermare che l'RNA è stato estratto in buone condizioni di integrità, poiché è possibile distinguere chiaramente le bande dovute all'RNA appartenente alle subunità ribosomali 28S e 18S. Considerando dall'RNA totale di una popolazione si ottiene circa il 10% di mRNA, i quantitativi di RNA totale a disposizione sono tali da consentire la purificazione dell'RNA messaggero necessario per le fasi successive di analisi.

I risultati della valutazione spettrofotometrica dell'mRNA isolato da piante di controllo e trattate sono riportati in Tabella 4.13.

Tabella 4.13. RNA messaggero ($\mu\text{g ml}^{-1}$) isolato dall'RNA totale estratto dalle foglie di *V. lantana* al termine dell'esposizione con ozono (60 ppb, 5 h d⁻¹ per 15 giorni consecutivi) (Trattato) a confronto con quello isolato da piante non sottoposte a trattamento (Controllo)

	ABS 280	ABS 260	ABS 230	Rapporto 260/280	Rapporto 260/230	mRNA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Trattato	0.25	0.522	0.497	2.09	1.05	0.021
Controllo	0.213	0.462	0.476	2.17	0.97	0.019

Com'è possibile osservare dal rapporto 260/280, la qualità dell'mRNA estratto è elevata rispetto alla quantità di proteine contaminanti e anche la concentrazione è sufficiente per poter procedere per ottenere la quantità di mRNA richiesta per la PCR *select* (come riportato da protocollo, 2 μg di mRNA).

Dopo la prima fase di ibridazione sottrattiva, le PCR effettuate hanno consentito di amplificare i cDNA repressi ed indotti da trattamento con ozono, che sono stati visualizzati tramite una corsa elettroforetica su gel d'agarosio (Figura 4.13). La prima banda di sinistra rappresenta il ladder utilizzato come riferimento noto per stabilire la grandezza dei frammenti di cDNA. La banda contrassegnata con "C" è indicativa delle sequenze specificatamente espresse solo nel controllo, e che dunque risultano represses nel campione trattato con ozono.

La banda contrassegnata con “O₃” rappresenta i geni specificatamente espressi dal campione trattato con ozono – ma che sono repressi nel trattato. Per questa seconda libreria il segnale è piuttosto debole, come evidenziato dalla scarsa luminosità della banda.

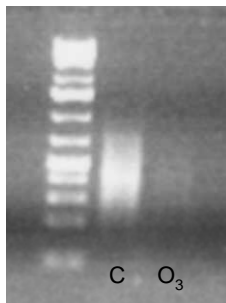


Figura 4.13. Sequenze differenzialmente espresse in foglie di *V. lantana* dopo 15 giorni di esposizione con ozono (60 ppb, 5 h d⁻¹) (O₃) a confronto con quella di piante non sottoposte a trattamento (C).

Sono dunque state effettuate ulteriori PCR, variando quantitativi e numero di cicli, per amplificare il cDNA di entrambi i campioni, al fine di ottenere sufficiente materiale per il successivo sequenziamento.

Portando il numero di cicli della prima PCR a 32 e quello della seconda PCR dai 10 originali a 15, 16, 17 e 18 cicli, si può osservare come il cDNA corrispondente alle sequenze indotte nel campione trattato con ozono raggiungano quantitativi comparabili a quelle repressi (C) (Figura 4.14), e quindi utilizzabili per le fasi future di identificazione dei geni a cui appartengono le sequenze differenzialmente espresse.

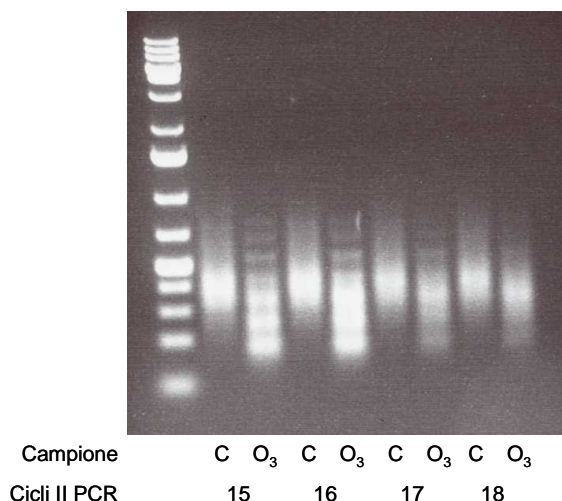


Figura 4.14. Prodotti di PCR dopo un numero diverso di cicli della PCR secondaria. È possibile osservare come con i nuovi cicli, il campione contenente le sequenze indotte nel trattato (O₃) abbia raggiunto quantitativi comparabili a quello delle sequenze repressi (C).

Sviluppi futuri

Poiché la tecnica d'ibridazione sottrattiva sembra evidenziare differenze tra le sequenze di mRNA estratti da esemplari di *V. lantana* sottoposti per 15 giorni a trattamento con O₃ (60 ppb, 5 h d⁻¹), rispetto agli esemplari non esposti all'inquinante, le prospettive future di approfondimento riguarderanno l'identificazione dei geni repressi/indotti a cui corrispondono i tratti di RNA amplificati. Specificamente, ciò verrà realizzato attraverso il sequenziamento ad alta resa (mediante la tecnica 454 *sequencing*) del DNA relativo ai trascritti differenzialmente presenti nei campioni delle due popolazioni in esame e, successivamente l'identificazione, con l'analisi bioinformatica, dei geni differenzialmente espressi -indotti e repressi dal trattamento con ozono. Questo permetterà di valutare le risposte della pianta al trattamento in termini di espressione genica.

4.4 Discussione

E' noto dalla letteratura che *V. lantana* è una specie sensibile all'ozono (Skelly *et al.*, 1998; Novak *et al.*, 2003; Orendovici *et al.*, 2003); esposta a tale inquinante, sviluppa un quadro sintomatico fogliare specifico (Innes *et al.*, 2001), mostra una riduzione dell'efficienza fotosintetica (Gravano *et al.*, 2004), dell'assimilazione di CO₂ e della conduttanza stomatica e un'alterazione di efficienza della Rubisco (Calatayud *et al.*, 2010). Orendovici *et al.* (2003) riportano un valore di AOT40 di circa 1200 ppb h come soglia per lo sviluppo di sintomi in ambiente controllato.

Con il presente lavoro è stato possibile integrare e approfondire le conoscenze esistenti con dati sul contenuto fogliare di clorofilla, sulla funzionalità dell'apparato fotosintetico e sulle ripercussioni sul metabolismo primario dei carboidrati, nonché sul ruolo dei pigmenti accessori nella protezione del sistema fotosintetico.

Nella sperimentazione i primi sintomi sono stati riscontrati dopo 15 giorni di trattamento con ozono, quando l'AOT40 aveva raggiunto circa 1500 ppb h. Contemporaneamente, il contenuto di clorofilla SPAD (misurato *in vivo*) nelle piante trattate con ozono risultava inferiore del 5% rispetto a quelle di controllo e tale differenza aumentava significativamente all'8% e al 18%, rispettivamente dopo 30 e 45 giorni di trattamento.

Seppur non statisticamente significativa, è stata anche verificata una riduzione del contenuto totale di clorofilla ($a+b$) e del rapporto clorofilla a /clorofilla b (HPLC): la riduzione dei pigmenti può rappresentare un meccanismo di protezione del PSII dalla fotoinibizione attraverso la riduzione del numero di antenne *light-harvesting*. Un altro sistema di protezione dell'apparato fotosintetico verso la fotoinibizione provocata dall'ozono è rappresentato dall'attivazione del ciclo delle xantofille (Pellegrini *et al.*, 2011b; Pellegrini *et al.*, 2011a): i dati di questo lavoro evidenziano però variazioni non significative dell'indice di de-epossidazione (DEPS), facendo supporre che tale processo di dissipazione termica dell'energia in eccesso non sia stato attivato nelle piante trattate di *V. lantana*. Dopo 30 giorni di trattamento con ozono, quando le piante risultavano essere state esposte ad una dose di AOT40 di circa 3.000 ppb h, si è rilevata una riduzione significativa del contenuto di carotenoidi, probabilmente come risultato di una degradazione ossidativa da parte di radicali dell'ossigeno.

Nelle piante trattate la diminuzione di $F_V/F_M (= \phi_{P0})$ - osservata sia con la fluorescenza diretta sia con la modulata - è indicativa di un danno fotoinibitorio ai centri di reazione del PSII; responsabili di questo declino sono l'aumento della fluorescenza minima (F_0) e la concomitante diminuzione della fluorescenza massima (F_M) durante tutto il periodo di trattamento. L'aumento di F_0 è considerato espressione di danno irreversibile al PSII ed indica che la dissipazione termica avviene in maniera non appropriata, con conseguente eccesso di eccitazione nelle foglie (Bussotti *et al.*, 2011a). Le piante trattate hanno fatto rilevare valori

più bassi di Ψ_{E0} , il che significa un rallentamento della riduzione primaria di Q_A . Sempre per le piante trattate, la comparsa della banda K – ovvero l'aumento di fluorescenza relativa a 300 μ s – testimonia che lo stress ossidativo da ozono ha provocato l'inattivazione dell'*oxygen evolving complex*. Benché le variazioni di questi parametri confermino che importanti cambiamenti in piante trattate con ozono avvengono nella regione O-J del *transient* della fluorescenza (Gravano *et al.*, 2004), quella che corrisponde agli eventi fotochimici, un significativo aumento è stato registrato anche nell'ampiezza della fase I-P. La fase I-P è connessa al trasferimento di elettroni al PSI ed un aumento della fluorescenza variabile relativa in questa fase è da attribuire al blocco di accettori di elettroni oltre il PSI. Anche questa parte di curva si è dimostrata sensibile all'ozono per *V. lantana*. Una sintesi del comportamento fotosintetico complessivo è data dal Performance Index totale: la riduzione significativa di questo parametro dopo 30 giorni di trattamento con ozono definisce chiaramente una situazione di ridotta capacità complessiva di cattura e conservazione dell'energia, dall'assorbimento dei fotoni nel PSII alla riduzione degli accettori finali del PSI.

Per quanto concerne i carboidrati totali, i dati ottenuti non sono sempre tali da consentire una chiara interpretazione di quanto avvenuto a livello di metabolismo primario. La significativa riduzione del contenuto di glucosio nei campioni trattati con ozono potrebbe rientrare nel quadro generale di un ridotto metabolismo primario di *V. lantana* in seguito ad esposizione all'ozono: ciò sarebbe, in sintesi, la conseguenza della ridotta capacità fotosintetica, del minore contenuto di clorofilla e del sistema non completamente efficace di protezione dalla fotoinibizione riscontrati nelle piante trattate con ozono attraverso le analisi ecofisiologiche e metaboliche effettuate in questo studio.

5.

CONCLUSIONI GENERALI

Con questo lavoro si è voluta verificare la possibilità di usare *V. lantana* – pianta arbustiva di ampia diffusione - come bioindicatore *in situ* per valutare l'effetto fitotossico dell'ozono troposferico sulla vegetazione spontanea. Per questo proposito occorreva preliminarmente verificare la rispondenza di tale specie ad alcuni requisiti, ritenuti essenziali per considerare un organismo come bioindicatore affidabile (Doley, 2010). Ampia distribuzione sul territorio (i), elevata sensibilità (ii) e specificità di risposta all'inquinante (iii) erano i requisiti che in letteratura risultavano già verificati per *V. lantana*: tali caratteristiche erano alla base dell'attenzione rivolta proprio a tale specie. Restavano da verificare due requisiti importanti: (iv) l'evoluzione temporale della risposta, ovvero la capacità di rispondere all'inquinante durante il periodo vegetativo e (v) la relazione tra intensità di risposta e livello di esposizione all'inquinante. Era inoltre importante poter verificare l'intero set di requisiti in condizioni di campo e verificare le risposte delle piante in condizioni controllate, situazione in cui ogni variazione di risposta possa essere attribuita al solo fattore di stress "ozono". Per perseguire tali obiettivi sono stati svolti due specifici studi in campo ed uno in ambiente controllato. Per quanto riguarda la valutazione delle risposte delle piante all'ozono, l'indicatore preso in considerazione in tutti gli studi è stato il sintomo fogliare, noto per la sua specificità nei confronti dell'ozono e la facilità d'identificazione. Sono stati inoltre introdotti anche altri indicatori di risposta, in modo da ottenere informazioni aggiuntive sulla fisiologia, sul metabolismo primario e sul comportamento a livello genico delle piante sottoposte a stress da ozono; tali indicatori di risposta sono stati di volta in volta adottati nei casi in cui il disegno e le condizioni sperimentali lo consentivano.

I principali risultati ottenuti sono di seguito riassunti, suddivisi per specifici obiettivi.

1) Verifica delle potenzialità di utilizzo di *V. lantana* come bioindicatore

Il primo studio realizzato in campo ha consentito di valutare la rispondenza di *V. lantana* al requisito (iv) - la capacità di rispondere all'ozono durante il periodo vegetativo - effettuando regolarmente, da maggio a settembre, misure ed osservazioni su gruppi di piante spontanee esposte a due differenti livelli di ozono.

I sintomi fogliari osservati in campo corrispondono a quelli riportati in letteratura (Innes *et al.*, 2001) e sono di facile riconoscimento. La comparsa dei primi sintomi fogliari in campo si è verificata all'inizio del mese di luglio (2009). L'incremento maggiore della frequenza di

piante sintomatiche è stato in seguito registrato tra la metà di luglio e la metà di agosto, periodo interessato dalla presenza di elevate concentrazioni di ozono. Le piante esposte ai livelli più elevati di ozono hanno sviluppato sintomi più precocemente e la loro frequenza è aumentata più rapidamente rispetto alle piante esposte a livelli di ozono più bassi.

In concomitanza con la comparsa e la diffusione dei sintomi fogliari, si è rilevata la diminuzione del contenuto di clorofilla nelle foglie e un calo della performance fotosintetica. Un indicatore precoce di risposta all'ozono è stato il parametro che indica la capacità dell'accettore finale di elettroni d'essere ridotto (ΔV_{I-P}); tale parametro ha mostrato valori più bassi nelle piante esposte ai livelli più alti di ozono nella seconda metà di giugno, quindi circa due - tre settimane prima della comparsa dei sintomi fogliari. Il parametro ΔV_{I-P} è già stato indicato da altri autori (Bussotti *et al.*, 2011a) come specifico nella risposta all'ozono; con questo lavoro si conferma tale specificità, anche nel caso di misure effettuate su piante spontanee e in condizioni reali di campo, oltre alla possibilità di ottenere indicazioni precoci di uno stato di stress della pianta.

La comparsa dei primi sintomi è avvenuta, in entrambi i siti, per valori di AOT40 superiori alla soglia critica di 9.000 ppb h, raggiunta già entro la fine di giugno.

Il secondo studio in campo ha consentito di affrontare il requisito (v) – l'esistenza di una relazione tra intensità di risposta di *V. lantana* e livello di esposizione all'ozono - attraverso l'osservazione di 10-30 piante sui 30 quadrati unichilometrici, stratificati per quota e livello di AOT40, selezionati secondo un criterio *random* sui circa 6.000 km² della provincia di Trento.

Da questo studio è emerso che, a parità di livello di esposizione all'ozono, le piante sintomatiche sono sempre più frequenti alle quote più elevate (sopra i 700 m s.l.m.). Questo dato, che conferma quanto osservato con il primo studio in campo, può essere spiegato da un maggior stress ossidativo, dovuto ad esempio alla radiazione solare, a cui sono sottoposte le piante che si trovano alle quote più elevate, nonché da condizioni ambientali che possono essere maggiormente favorevoli all'assorbimento stomatico di ozono.

Anche se non è stata verificata una relazione diretta significativa dose/risposta, ovvero tra livelli di esposizione all'ozono e percentuale di piante sintomatiche, è stata riscontrata una maggior probabilità di trovare piante sintomatiche nei siti con i livelli più alti di ozono. Questo aspetto è da ritenersi in linea con l'informazione che si vuole trarre dal bioindicatore *in situ* che mira a valutare l'impatto reale dell'inquinante sulla vegetazione presente in una certa zona e soggetta alle effettive condizioni ambientali della zona stessa. Questo approccio comporta, peraltro, che i risultati siano più difficilmente interpretabili per la variabilità genotipica e/o fenotipica delle piante.

I due studi in campo hanno consentito di verificare uno sviluppo temporale delle risposte di *V. lantana* coerente con l'andamento dei livelli di esposizione all'ozono e i sintomi sono risultati più frequenti ai livelli più elevati di ozono.

I sintomi fogliari si sono confermati essere dei validi indicatori di risposta all'ozono; la loro valutazione è più soggettiva rispetto a misure ecofisiologiche strumentali, ma è rapida e non richiede la presenza di un controllo: i dati che si ottengono hanno, in sé, un valore assoluto e, per la loro interpretazione, non occorre metterli in relazione con dati acquisiti su piante non sottoposte al fattore di stress.

2) Confronto dei risultati ottenuti in campo e in ambiente controllato

La sperimentazione in ambiente controllato ha consentito di ottenere sia dati confrontabili con quelli rilevati in campo - avendo adottato un set di misure ed osservazioni comune per tipologia e per numerosità campionarie - sia dati utili per approfondire le conoscenze sul comportamento metabolico della pianta in risposta all'ozono.

Per quanto riguarda i sintomi fogliari, il contenuto di clorofilla SPAD e la fluorescenza diretta della clorofilla *a*, i dati ottenuti in ambiente controllato confermano quanto osservato in campo.

I sintomi fogliari rilevati in campo sono stati ulteriormente convalidati con quelli osservati in ambiente controllato; in entrambi i casi, il quadro sintomatologico è stato validato mediante analisi microscopica di sezioni del mesofillo al fine di attribuire con certezza la causa all'ozono.

Le piante esposte all'ozono - sia in campo sia in ambiente controllato - hanno mostrato la presenza di sintomi fogliari già a livelli di esposizione all'ozono di circa $6.000 \mu\text{g m}^{-3}$. Il successivo sviluppo temporale dei sintomi è risultato coerente con l'aumento dei livelli di esposizione all'inquinante. In entrambe le situazioni sperimentali, alla comparsa e diffusione dei sintomi fogliari è corrisposta una riduzione del contenuto di clorofilla SPAD, significativa in ambiente controllato dopo un'esposizione all'ozono di circa $9.000 \mu\text{g m}^{-3}$. Effetti dell'ozono sono stati riscontrati, in campo e in ambiente controllato, anche sull'efficienza fotosintetica con una riduzione progressiva del Performance Index e della capacità dell'accettore finale di elettroni d'essere ridotto (ΔV_{I-P}).

Benché coerenti come direzione, le risposte all'ozono delle piante trattate in ambiente controllato e di quelle in campo si sono manifestate con differente intensità.

Complessivamente, i dati acquisiti in campo e in ambiente controllato fanno supporre che, in seguito a stress da ozono, *V. lantana* non sia in grado di attivare un efficace meccanismo di dissipazione termica dell'energia e che questo possa stare alla base della sensibilità di tale

specie nei confronti dell'inquinante: gli elettroni liberi potrebbero provocare la formazione di ROS e tali sostanze sarebbero la causa di processi di foto-ossidazione del contenuto cellulare che determinerebbero lo sviluppo dei sintomi fogliari.

I sintomi in campo si sono manifestati a valori di AOT40 sia superiori che inferiori a quelli fissati dalla direttiva europea per la protezione della vegetazione (9.000 ppb h). Come già discusso da altri autori (Fuhrer *et al.*, 1997; Ferretti *et al.*, 2007a), l'indice AOT40 - derivato da studi in ambiente controllato - non sempre sembra adatto per stimare l'impatto dell'ozono in condizioni di campo e su larga scala. Anche in presenza di valori di esposizione all'ozono potenzialmente dannosi, non sempre si riscontra la presenza di sintomi sulle piante (Baumgarten *et al.*, 2009; Hunova *et al.*, 2011) e viceversa. Questo comportamento potrebbe trovare una spiegazione nell'approccio dei flussi stomatici, considerando dunque la dose di ozono assorbita piuttosto che i livelli dell'inquinante in atmosfera. Tale approccio richiede però la conoscenza di una serie di parametri ambientali ed ecofisiologici, indispensabili per stimare la conduttanza stomatica e l'assorbimento stomatico, non sempre facilmente disponibili e inoltre non considera le strategie difensive della pianta che potrebbero limitare il reale impatto dell'inquinante.

La risposta del bioindicatore, invece, riflette complessivamente l'azione dei parametri ambientali che influenzano l'assorbimento stomatico e le difese della pianta, rispondendo in tal modo all'esigenza di conoscere il reale impatto dell'ozono sulla vegetazione.

Le risposte delle piante all'ozono comprendono numerose variazioni fisiologiche e biochimiche, che sono il risultato di variazioni nell'espressione genica. E' noto, ad esempio, che geni indotti dal trattamento con ozono sono gli stessi indotti nei meccanismi di difesa nei confronti di patogeni (Sharma & Davis, 1997). Lo studio delle variazioni dell'espressione genica in seguito a trattamento con ozono potrà aiutare nella comprensione dei meccanismi di difesa e tolleranza nei confronti dello stress ossidativo. Queste caratteristiche possono rivelarsi particolarmente importanti se si considera il problema ozono nella prospettiva che esso possa creare competizione tra specie, arrivando a mettere a rischio la sopravvivenza di quelle particolarmente sensibili. Oltre all'effetto sulla biodiversità, una ridotta vitalità della pianta causata dall'ozono può anche rendere la pianta stessa maggiormente suscettibile nei confronti di patogeni (Eastburn *et al.*, 2011).

In estrema sintesi, dai risultati ottenuti si può concludere che la specie arbustiva *V. lantana* L. sembra adatta per valutare in maniera qualitativa l'impatto potenziale dell'ozono in aree remote; i sintomi fogliari si confermano essere dei validi indicatori di risposta all'ozono.

6.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, W.W., III & Demmig-Adams, B. (1995) The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. *Plant, Cell and Environment*, 18, 117-127.
- Adir, N., Zer, H., Shochat, S. & Ohad, I. (2003) Photoinhibition - a historical perspective. *Photosynthesis Research*, 76, 343-370.
- Amoriello, T., Spinazzi, F., Gerosa, G., Costantini, A., Buffoni, A. & Ferretti, M. (2003) Ozone levels and meteorological variables at the permanent monitoring plots of the CONECOFOR programme in Italy. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura*, 30, 41-52.
- Ashmore, M.R. (2005) Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant Cell and Environment*, 28, 949-964.
- Bacaro, G., Calderisi, M., Cristofolini, F., Cristofori, A., Gottardini, E., Rocchini, D. & Ferretti, M. (2008) Studio di un modello per la stima dell'ozono troposferico in provincia di Trento. Final report. Contract between IASMA and Servizio Foreste e Fauna della Provincia Autonoma di Trento (Contract N. 4297 del 12/3/08), 45 pp.
- Baumgarten, M., Huber, C., Buker, P., Emberson, L., Dietrich, H.P., Nunn, A.J., Heerdt, C., Beudert, B. & Matyssek, R. (2009) Are Bavarian Forests (southern Germany) at risk from ground-level ozone? Assessment using exposure and flux based ozone indices. *Environmental Pollution*, 157, 2091-2107.
- Bindi, M., Hacour, A., Vandermeiren, K., Craigon, J., Ojanpera, K., Sellden, G., Høgy, P., Finnán, J. & Fibbi, L. (2002) Chlorophyll concentration of potatoes grown under elevated carbon dioxide and/or ozone concentrations. *European Journal of Agronomy*, 17, 319-335.
- Booker, F., Muntifering, R., McGrath, M., Burkey, K., Decoteau, D., Fiscus, E., Manning, W., Krupa, S., Chappelka, A. & Grantz, D. (2009) The Ozone Component of Global Change: Potential Effects on Agricultural and Horticultural Plant Yield, Product

- Quality and Interactions with Invasive Species. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51, 337-351.
- Bussotti, F. (2008) Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Global Change Biology*, 14, 2727-2739.
- Bussotti, F. & Ferretti, M. (2009) Visible injury, crown condition, and growth responses of selected Italian forests in relation to ozone exposure. *Environmental Pollution*, 157, 1427-1437.
- Bussotti, F., Schaub, M., Cozzi, A., Krauchi, N., Ferretti, M., Novak, K. & Skelly, J.M. (2003) Assessment of ozone visible symptoms in the field: perspectives of quality control. *Environmental Pollution*, 125, 81-89.
- Bussotti, F., Agati, G., Desotgiu, R., Matteini, P. & Tani, C. (2005) Ozone foliar symptoms in woody plant species assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytologist*, 166, 941-955.
- Bussotti, F., Schaub, M., Cozzi, A., Gerosa, G., Novak, K. & Hug, C. (2006) Sources of errors in assessing ozone visible symptoms on native vegetation. *Environmental Pollution*, 140, 257-268.
- Bussotti, F., Strasser, R.J. & Schaub, M. (2007) Photosynthetic behavior of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-test: A review. *Environmental Pollution*, 147, 430-437.
- Bussotti, F., Desotgiu, R., Cascio, C., Pollastrini, M., Gravano, E., Gerosa, G., Marzuoli, R., Nali, C., Lorenzini, G., Salvatori, E., Manes, F., Schaub, M. & Strasser, R.J. (2011a) Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 19-30.
- Bussotti, F., Pollastrini, M., Cascio, C., Desotgiu, R., Gerosa, G., Marzuoli, R., Nali, C., Lorenzini, G., Pellegrini, E., Carucci, M.G., Salvatori, E., Fusaro, L., Piccotto, M., Malaspina, P., Manfredi, A., Roccotello, E., Toscano, S., Gottardini, E., Cristofori, A., Fini, A., Weber, D., Baldassarre, V., Barbanti, L., Monti, A. & Strasser, R.J. (2011b) Conclusive remarks. Reliability and comparability of chlorophyll fluorescence data from several field teams. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 116-119.

- Bytnerowicz, A., Godzik, B., Grodzinska, K., Fraczek, W., Musselman, R., Manning, W., Badea, O., Popescu, F. & Fleischer, P. (2004) Ambient ozone in forests of the Central and Eastern European mountains. *Environmental Pollution*, 130, 5-16.
- Calatayud, V., Marco, F., Cervero, J., Sanchez-Pena, G. & Jose Sanz, M. (2010) Contrasting ozone sensitivity in related evergreen and deciduous shrubs. *Environmental Pollution*, 158, 3580-3587.
- Castagna, A. & Ranieri, A. (2009) Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution*, 157, 1461-1469.
- Chappelka, A., Skelly, J., Somers, G., Renfro, J. & Hildebrand, E. (1999) Mature black cherry used as a bioindicator of ozone injury. *Water Air and Soil Pollution*, 116, 261-266.
- Ciampi, S., Castagna, A., Ranieri, A., Nali, C., Lorenzini, G. & Soldatini, G.F. (1997) CO₂ assimilation, xanthophyll cycle pigments and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. *Physiologia Plantarum*, 101, 881-889.
- Colbeck, I. & Harrison, R.M. (1985) The frequency and causes of elevated concentrations of ozone at ground-level at rural sites in Northwest England. *Atmospheric Environment*, 19, 1577-1587.
- Coulston, J.W., Smith, G.C. & Smith, W.D. (2003) Regional assessment of ozone sensitive tree species using bioindicator plants. *Environmental Monitoring and Assessment*, 83, 113-127.
- Cristofolini, F., Cristofori, A., Gottardini, E., Maccherini, S. & Ferretti, M. (2011) Constraints in the identification and interpretation of ozone as a significant predictor of effects on the supersensitive indicator *Nicotiana tabacum* Bel-W3 in biomonitoring studies. *Ecological Indicators*, 11, 1065-1073.
- Davis, D.D. & Orendovici, T. (2006) Incidence of ozone symptoms on vegetation within a National Wildlife Refuge in New Jersey, USA. *Environmental Pollution*, 143, 555-564.
- Derwent, R.G., Simmonds, P.G., Manning, A.J. & Spain, T.G. (2007) Trends over a 20-year period from 1987 to 2007 in surface ozone at the atmospheric research station, Mace Head, Ireland. *Atmospheric Environment*, 41, 9091-9098.

- Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council on ambient air quality and cleaner air for Europe. In. Journal of the European Union. 11 June 2008, L152, 1–44
- Doley, D. (2010) Rapid quantitative assessment of visible injury to vegetation and visual amenity effects of fluoride air pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160, 181-198.
- Eastburn, D.M., McElrone, A.J. & Bilgin, D.D. (2011) Influence of atmospheric and climatic change on plant-pathogen interactions. *Plant Pathology*, 60, 54-69.
- EEA (2009) Assessment of ground-level ozone in EEA member countries, with a focus on long-term trends. European Environment Agency Report no 7/2009. ISSN 1725-2237. In. European Environment Agency Report no 7/2009. ISSN 1725-2237
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Cambridge, H.M., Simpson, D. & Tuovinen, J.P. (2000) Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environmental Pollution*, 109, 403-413.
- Falla, J., Laval-Gilly, P., Henryon, M., Morlot, D. & Ferard, J.F. (2000) Biological air quality monitoring: A review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 64, 627-644.
- Ferretti, M. (2009) Quality Assurance in ecological monitoring-towards a unifying perspective. *Journal of Environmental Monitoring*, 11, 726-729.
- Ferretti, M. (2011) Quality assurance: a vital need in ecological monitoring. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6, 1-14.
- Ferretti, M. & Cozzi, A. (2002) Alcuni problemi metodologici nella valutazione e quantificazione dei sintomi da ozono in rilevamenti di campagna. *Informatore Fitopatologico*, 31-38.
- Ferretti, M., Brusasca, G., Buffoni, A., Bussotti, F., Cozzi, A., Petriccione, B., Pompeii, E. & Silibello, C. (2003) Ozone risk in the permanent plots of the Italian intensive monitoring of forest ecosystems. - An introduction. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura*, 30, 3-28.
- Ferretti, M., Calderisi, M. & Bussotti, F. (2007a) Ozone exposure, defoliation of beech (*Fagus sylvatica* L.) and visible foliar symptoms on native plants in selected plots of South-Western Europe. *Environmental Pollution*, 145, 644-651.

- Ferretti, M., Fagnano, M., Amoriello, T., Badiani, M., Ballarin-Denti, A., Buffoni, A., Bussotti, F., Castagna, A., Cieslik, S., Costantini, A., De Marco, A., Gerosa, G., Lorenzini, G., Manes, F., Merola, G., Nali, C., Paoletti, E., Petriccione, B., Racalbuto, S., Rana, G., Ranieri, A., Tagliaferri, A., Vialetto, G. & Vitale, M. (2007b) Measuring, modelling and testing ozone exposure, flux and effects on vegetation in southern European conditions - What does not work? A review from Italy. *Environmental Pollution*, 146, 648-658.
- Ferretti, M., Koenig, N., Rautio, P. & Sase, H. (2009) Quality assurance (QA) in international forest monitoring programmes: activity, problems and perspectives from East Asia and Europe. *Annals of Forest Science*, 66
- Ferretti, M., Cristofolini, F., Cristofori, A., Gerosa, G. & Gottardini, E. Estimating ozone AOT40 from raw passive sampling data. In prep.
- Fiscus, E.L., Booker, F.L. & Burkey, K.O. (2005) Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant Cell and Environment*, 28, 997-1011.
- Fishman, J., Vukovich, F.M. & Browell, E.V. (1985) The photochemistry of synoptic-scale ozone synthesis - Implications for the global tropospheric ozone budget. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 3, 299-320.
- Fuhrer, J., Skarby, L. & Ashmore, M.R. (1997) Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution*, 97, 91-106.
- Gambino, G., Perrone, I. & Gribaudo, I. (2008) A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants. *Phytochemical Analysis*, 19, 520-525.
- Genty, B., Briantais, J.M. & Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 990, 87-92.
- Gerosa, G. & Anfodillo, T. (2003) Modelling stomatal uptake of ozone: data requirements and applicability to the CONECOFOR PMPs in Italy. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura*, 30, 85-97.
- Gerosa, G., Ferretti, M., Bussotti, F. & Rocchini, D. (2007) Estimates of ozone AOT40 from passive sampling in forest sites in South-Western Europe. *Environmental Pollution*, 145, 629-635.

- Giannouli, M., Kalognomou, E.-A., Mellios, G., Moussiopoulos, N., Samaras, Z. & Fiala, J. (2011) Impact of European emission control strategies on urban and local air quality. *Atmospheric Environment*, 45, 4753-4762.
- Gottardini, E., Cristofolini, F., Cristofori, A. & Ferretti, M. (2009) Ozono troposferico in provincia di Trento: livelli ed effetti sulla vegetazione nel 2008. Relazione tecnica dello studio realizzato nel 2008 nell'ambito delle convenzioni stipulate dalla Fondazione Edmund Mach con il Servizio Foreste e Fauna e con l'Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente della Provincia Autonoma di Trento. 35 pp. <http://hdl.handle.net/10449/20388>
- Gottardini, E., Cristofori, A., Cristofolini, F. & Ferretti, M. (2010a) Variability of ozone concentration in a montane environment, northern Italy. *Atmospheric Environment*, 44, 147-152.
- Gottardini, E., Fabiana, C., Antonella, C., Marco, F., Giovanni, B. & Francesco, G. (2010b) Ozono troposferico in provincia di Trento: livelli ed effetti sulla vegetazione nel 2009. Relazione tecnica dello studio realizzato nel 2009 nell'ambito delle convenzioni stipulate dalla Fondazione Edmund Mach con il Servizio Foreste e Fauna e con l'Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente della Provincia Autonoma di Trento. 56 pp. <http://hdl.handle.net/10449/20389>
- Gottardini, E., Cristofolini, F., Cristofori, A., Confalonieri, M. & Ferretti, M. (2011a) EFFORT (Ozone EEffects on FORests in Trentino): c'è un impatto misurabile dell'ozono sulla vegetazione in Trentino? *VIII Congresso SISEF, Rende (CS) 4-7 Ottobre 2011, Poster #c10.15* http://www.sisef.it/sisef/cong08.php?action=contrib_show&id=155
- Gottardini, E., Cristofolini, F., Cristofori, A., Ferretti, M., Bacaro, G., Geri, F., Santi, E. & Veronesi, L. (2011b) Ozono troposferico in provincia di Trento: livelli ed effetti sulla vegetazione nel 2010. Relazione tecnica dello studio realizzato nel 2010 nell'ambito dell'incarico affidato alla Fondazione Edmund Mach dal Servizio Foreste e Fauna della Provincia Autonoma di Trento. 58 pp +All. I <http://hdl.handle.net/10449/20390>
- Goumenaki, E., Taybi, T., Borland, A. & Barnes, J. (2010) Mechanisms underlying the impacts of ozone on photosynthetic performance. *Environmental and Experimental Botany*, 69, 259-266.

- Gravano, E., Bussotti, F., Strasser, R.J., Schaub, M., Novak, K., Skelly, J. & Tani, C. (2004) Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum*, 121, 620-633.
- Guderian, R., Tingey, D.T. & Rabe, R. (1985) Effects of photochemical oxidants on plants. *Air pollution by photochemical oxidants*, 129-331.
- Gunthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P. (2007) Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environmental Pollution*, 147, 467-488.
- Heagle, A.S., Miller, J.E. & Sherrill, D.E. (1994) A white clover system to estimate effects of tropospheric ozone on plants. *Journal of Environmental Quality*, 23, 613-621.
- Heath, R.L. (1994) Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynthesis Research*, 39, 439-451.
- Heggestad, H.E. (1991) Origin of Bel-W3, Bel -C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution*, 74, 264-291.
- Hirayama, T. & Shinozaki, K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant Journal*, 61, 1041-1052.
- Hunova, I., Matouskova, L., Srnensky, R. & Kozelkova, K. (2011) Ozone influence on native vegetation in the Jizerske hory Mts. of the Czech Republic: results based on ozone exposure and ozone-induced visible symptoms. *Environmental Monitoring and Assessment*, 183, 501-515.
- Innes, J.L., Skelly, J.M. & Schaub, M. (2001) Ozone and broadleaved species. A guide to the identification of ozone-induced foliar injury. Ozon, Laubholz- und Krautpflanzen. Ein Führer zum Bestimmen von Ozonsymptomen. Birmensdorf, Eidgenössische Forschungsanstalt WSL, Bern, Stuttgart, Wien.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F. (2006) Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environmental Pollution*, 141, 275-282.
- Kangasjarvi, J., Jaspers, P. & Kollist, H. (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Cell and Environment*, 28, 1021-1036.

- Karlsson, P.E., Uddling, J., Braun, S., Broadmeadow, M., Elvira, S., Gimeno, B.S., Le Thiec, D., Oksanen, E., Vandermeiren, K., Wilkinson, M. & Emberson, L. (2004) New critical levels for ozone effects on young trees based on AOT40 and simulated cumulative leaf uptake of ozone. *Atmospheric Environment*, 38, 2283-2294.
- Karlsson, P.E., Pleijel, H., Belhaj, M., Danielsson, H., Dahlin, B., Andersson, M., Hansson, M., Munthe, J. & Grennfelt, P. (2005) Economic assessment of the negative impacts of ozone on crop yields and forest production. A case study of the estate Ostads Sateri in southwestern Sweden. *Ambio*, 34, 32-40.
- Keutgen, A.J., Noga, G. & Pawelzik, E. (2005) Cultivar-specific impairment of strawberry growth, photosynthesis, carbohydrate and nitrogen accumulation by ozone. *Environmental and Experimental Botany*, 53, 271-280.
- Kivimaenpää, M., Sutinen, S., Calatayud, V. & Jose Sanz, M. (2010) Visible and microscopic needle alterations of mature Aleppo pine (*Pinus halepensis*) trees growing on an ozone gradient in eastern Spain. *Tree Physiology*, 30, 541-554.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Vergne, P., Sifakis, N., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Rø-Poulsen, H., Ribas, A., Penuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V. (2006) Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment*, 40, 7437-7448.
- Kollmann, J. & Grubb, P.J. (2002) *Viburnum lantana* L. and *Viburnum opulus* L. (*V. lobatum* Lam., *Opulus vulgaris* Borkh.). *Journal of Ecology*, 90, 1044-1070.
- Krupa, S.V., Manning, W.J. & Nosal, M. (1993) Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution - An analysis of exposure-response relationships. *Environmental Pollution*, 81, 137-146.
- Krupa, S., McGrath, M.T., Andersen, C.P., Booker, F.L., Burkey, K.O., Chappelka, A.H., Chevone, B.I., Pell, E.J. & Zilinskas, B.A. (2001) Ambient ozone and plant health. *Plant Disease*, 85, 4-12.
- Langebartels, C., Heller, W., Fuhrer, G., Lippert, M., Simons, S. & Sandermann, H. (1998) Memory effects in the action of ozone on conifers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41, 62-72.

- Lawson, T., Craigon, J., Tulloch, A.M., Black, C.R., Colls, J.J. & Landon, G. (2001) Photosynthetic responses to elevated CO₂ and O₃ in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Physiology*, 158, 309-323.
- Lichtenthaler, H.K. & Rinderle, U. (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 19, S29-S85.
- Loibl, W., Winiwarter, W., Kopsca, A., Zueger, J. & Baumann, R. (1994) Estimations the spatial-distribution of ozone concentrations in complex terrain. *Atmospheric Environment*, 28, 2557-2566.
- Lorenzini, G. (1994) A miniaturized kit for ozone biomonitoring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48, 1-4.
- Lorenzini, G. & Nali, C. (2005) *Le piante e l'inquinamento dell'aria*. Springer-Verlag, Italia.
- Lorenzini, G., Nali, C. & Biagioni, M. (1995a) Long-range transport of photochemical ozone over the tyrrhenian sea demonstrated by a new miniaturized bioassay with ozone-sensitive tobacco seedlings. *Science of the Total Environment*, 166, 193-199.
- Lorenzini, G., Nali, C. & Biagioni, M. (1995b) An analysis of the distribution of surface ozone in Tuscany (Central Italy) with the use of a new miniaturized bioassay with ozone-sensitive tobacco seedlings. *Environmental Monitoring and Assessment*, 34, 59-72.
- Manning, W.J., Godzik, B. & Musselman, R. (2002) Potential bioindicator plant species for ambient ozone in forested mountain areas of central Europe. *Environmental Pollution*, 119, 283-290.
- Markert, B. (2007) Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 77-82.
- Matyssek, R. & Innes, J.L. (1999) Ozone - A risk factor for trees and forests in Europe? *Water Air and Soil Pollution*, 116, 199-226.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668.

- Mills, G., Hayes, F., Williams, P. & Harmens, H. (2005) ICP Vegetation experimental protocol for monitoring the incidences of ozone injury on vegetation. Natural Environment Research Council, pp. 20.
- Mills, G., Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V., Holland, M., Emberson, L. & Pleijel, H. (2007) A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmospheric Environment*, 41, 2630-2643.
- Mills, G., Hayes, F., Simpson, D., Emberson, L., Norris, D., Harmens, H. & Buker, P. (2011) Evidence of widespread effects of ozone on crops and (semi-)natural vegetation in Europe (1990-2006) in relation to AOT40-and flux-based risk maps. *Global Change Biology*, 17, 592-613.
- Moldau, H., Vahisalu, T. & Kollist, H. (2011) Rapid stomatal closure triggered by a short ozone pulse is followed by reopening to overshooting values. *Plant signaling & behavior*, 6, 311-3.
- Nali, C., Francini, A. & Lorenzini, G. (2006) Biological monitoring of ozone: the twenty-year Italian experience. *Journal of Environmental Monitoring*, 8, 25-32.
- Neufeld, H.S., Chappelka, A.H., Somers, G.L., Burkey, K.O., Davison, A.W. & Finkelstein, P.L. (2006) Visible foliar injury caused by ozone alters the relationship between SPAD meter readings and chlorophyll concentrations in cutleaf coneflower. *Photosynthesis Research*, 87, 281-286.
- Niinemets, U. (2010) Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management*, 260, 1623-1639.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R. & Bjorkman, O. (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell*, 10, 1121-1134.
- Novak, K., Skelly, J.M., Schaub, M., Krauchi, N., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P. (2003) Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environmental Pollution*, 125, 41-52.
- Novak, K., Cherubini, P., Saurer, M., Fuhrer, J., Skelly, J.M., Krauchi, N. & Schaub, M. (2007) Ozone air pollution effects on tree-ring growth, delta C-13, visible foliar injury and leaf gas exchange in three ozone-sensitive woody plant species. *Tree Physiology*, 27, 941-949.

- Novak, K., Schaub, M., Fuhrer, J., Skelly, J.M., Frey, B. & Krauchi, N. (2008) Ozone effects on visible foliar injury and growth of *Fagus sylvatica* and *Viburnum lantana* seedlings grown in monoculture or in mixture. *Environmental and Experimental Botany*, 62, 212-220.
- Olbrich, M., Betz, G., Gerstner, E., Langebartels, C., Sandermann, H. & Ernst, D. (2005) Transcriptome analysis of ozone-responsive genes in leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biology*, 7, 670-676.
- Orendovici, T., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A., Savage, J.E., Sanz, M.J. & Smith, G.C. (2003) Response of native plants of northeastern United States and southern Spain to ozone exposures; determining exposure/response relationships. *Environmental Pollution*, 125, 31-40.
- Paoletti, E., Ferrara, A.M., Calatayud, V., Cervero, J., Giannetti, F., Sanz, M.J. & Manning, W.J. (2009) Deciduous shrubs for ozone bioindication: *Hibiscus syriacus* as an example. *Environmental Pollution*, 157, 865-870.
- Payne, R.J., Stevens, C.J., Dise, N.B., Gowing, D.J., Pilkington, M.G., Phoenix, G.K., Emmett, B.A. & Ashmore, M.R. (2011) Impacts of atmospheric pollution on the plant communities of British acid grasslands. *Environmental Pollution*, 159, 2602-2608.
- Pellegrini, E., Francini, A., Lorenzini, G. & Nali, C. (2011a) PSII photochemistry and carboxylation efficiency in *Liriodendron tulipifera* under ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany*, 70, 217-226.
- Pellegrini, E., Carucci, M.G., Campanella, A., Lorenzini, G. & Nali, C. (2011b) Ozone stress in *Melissa officinalis* plants assessed by photosynthetic function. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 94-101.
- Pfleeger, T.G., Plocher, M. & Bichel, P. (2010) Response of pioneer plant communities to elevated ozone exposure. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 138, 116-126.
- Pignatti, S. (1982) Flora d'Italia. Edagricole
- Plochl, M., Lyons, T., Ollerenshaw, J. & Barnes, J. (2000) Simulating ozone detoxification in the leaf apoplast through the direct reaction with ascorbate. *Planta*, 210, 454-467.

- Ranieri, A., Giuntini, D., Ferraro, F., Nali, C., Baldan, B., Lorenzini, G., Soldatini, G.F. & Soldatini, F. (2001) Chronic ozone fumigation induces alterations in thylakoid functionality and composition in two poplar clones. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 999-1008.
- Redillas, M., Strasser, R.J., Jeong, J.S., Kim, Y.S. & Kim, J.K. (2011) The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. *Plant Biotechnology Reports*, 5, 169-175.
- Reichenauer, T., BolharNordenkamp, H.R., Ehrlich, U., Soja, G., Postl, W.F. & Halbwachs, F. (1997) The influence of ambient and elevated ozone concentrations on photosynthesis in *Populus nigra*. *Plant Cell and Environment*, 20, 1061-1069.
- Remic, T., Sircelj, H., Turk, B. & Batic, F. (2002) Effects of troposphere ozone on wayfaring tree (*Viburnum lantana* L.). *Zbornik Gozdarstva in Lesarstva*, 43-59.
- Rizzo, M., Bernardi, R., Salvini, M., Nali, C., Lorenzini, G. & Durante, M. (2007) Identification of differentially expressed genes induced by ozone stress in sensitive and tolerant poplar hybrids. *Journal of Plant Physiology*, 164, 945-949.
- Sander mann, H. (1996) Ozone and plant health. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 347-366.
- Sander mann, H. (2000) Ozone/biotic disease interactions: molecular biomarkers as a new experimental tool. *Environmental Pollution*, 108, 327-332.
- Savenstrand, H., Brosche, M., Angehagen, M. & Strid, A. (2000) Molecular markers for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridization: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant Cell and Environment*, 23, 689-700.
- Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P. & Tsigaridas, K. (2011) Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. *Environmental Pollution*, 159, 3560-3570.
- Scebba, F., Giuntini, D., Castagna, A., Soldatini, G. & Ranieri, A. (2006) Analysing the impact of ozone on biochemical and physiological variables in plant species belonging to natural ecosystems. *Environmental and Experimental Botany*, 57, 89-97.

- Schansker, G., Toth, S.Z. & Strasser, R.J. (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1706, 250-261.
- Screpanti, A. & De Marco, A. (2009) Corrosion on cultural heritage buildings in Italy: A role for ozone? *Environmental Pollution*, 157, 1513-1520.
- Sharma, Y.K. & Davis, K.R. (1997) The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 480-488.
- Skarby, L., Ro-Poulsen, H., Wellburn, F.A.M. & Sheppard, L.J. (1998) Impacts of ozone on forests: a European perspective. *New Phytologist*, 139, 109-122.
- Skelly, J.M., Innes, J.L., Snyder, K.R., Savage, J.E., Hug, C., Landolt, W. & Bleuler, P. (1998) Investigations of ozone induced injury in forests of southern Switzerland: Field surveys and open-top chamber experiments. (ed by, pp. 995-1000.
- Smith, G.C., Smith, W.D. & Coulston, J.W. (2007) Ozone bioindicator sampling and estimation. *General Technical Report - Northern Research Station, USDA Forest Service*, ii + 34 pp.
- Soja, G., Eid, M., Gangl, H. & Redl, H. (1997) Ozone sensitivity of grapevine (*Vitis vinifera* L.): Evidence for a memory effect in a perennial crop plant? *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 37, 265-270.
- Stafoggia, M., Forastiere, F., Faustini, A., Biggeri, A., Bisanti, L., Cadum, E., Cernigliaro, A., Mallone, S., Pandolfi, P., Serinelli, M., Tessari, R., Vigotti, M.A., Perucci, C.A. & EpiAir, G. (2010) Susceptibility Factors to Ozone-related Mortality. A Population-based Case-Crossover Analysis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182, 376-384.
- Stockwell, W.R., Kramm, G., Scheel, H.E., Mohnen, V.A. & Seiler, W. (1997) *Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States*. Ecological studies, vol. 127, Sandermann et al. (eds.). Forest decline and ozone, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Strasser, R. & Govindjee (1992) On the O-J-I-P fluorescence transient in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research*, 34, 135-135.
- Strasser, R.J., Srivastava, A. & Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll-alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61, 32-42.

- Strasser, R.J., Srivastava, A. & Tsimilli-Michael, M. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation* (ed. by M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty), p. 558. Taylor & Francis, London - New York.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. & Alaka, S. (2004) Analysis of the Fluorescence Transient. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis* (ed. by G.C. Papageorgiou and Govindjee), pp. 321-362. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S. & Goltsev, V. (2010) Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797, 1313-1326.
- TECHNE, C.s.r.l. (2006) *Studio modellistico sulla generazione e trasporto dell'ozono*. APPA TN.
- Thayer, S.S. & Bjorkman, O. (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research*, 23, 331-343.
- UN/ECE (1996) Eds: L. Kärenlampi. and L. Skärby. *Critical levels for ozone in Europe: testing and finalising the concepts. UN-ECE workshop report. University of Kuopio, Finland*.
- UN/ECE (2004) Manual on the methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads and levels and air pollution effects, risks and trends. Revision 2004.
- VanderHeyden, D., Skelly, J., Innes, J., Hug, C., Zhang, J., Landolt, W. & Bleuler, P. (2001) Ozone exposure thresholds and foliar injury on forest plants in Switzerland. *Environmental Pollution*, 111, 321-331.
- Varotsos, C., Tzanis, C. & Cracknell, A. (2009) The enhanced deterioration of the cultural heritage monuments due to air pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 590-592.
- VDI (2003) *VDI 3957. Part 6. Biological measuring techniques for the determination und evaluation of the effects of air pollutants on plants (bioindication) – Determination and evaluation of the phytotoxic effect of photooxidants – Method of the standardised tobacco exposure*. Verein Deutscher Ingenieure, Düsseldorf.

- Vingarzan, R. (2004) A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment*, 38, 3431-3442.
- Vollenweider, P., Ottiger, M. & Gunthardt-Goerg, M.S. (2003) Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution*, 124, 101-118.
- Waldner, P., Schaub, M., Pannatier, E.G., Schmitt, M., Thimonier, A. & Walthert, L. (2007) Atmospheric deposition and ozone levels in Swiss forests: Are critical values exceeded? *Environmental Monitoring and Assessment*, 128, 5-17.
- WHO (2008) Health risks of ozone from long-range transboundary air pollution. Amann, M. *et al.* (eds.), pp. 93.
- Willits, D.H. & Peet, M.M. (2001) Measurement of chlorophyll fluorescence as a heat stress indicator in tomato: Laboratory and greenhouse comparisons. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 188-194.
- Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Naidu, S.L., Karnosky, D.F. & Long, S.P. (2009) Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Global Change Biology*, 15, 396-424.
- Wohlgemuth, H., Mittelstrass, K., Kschieschan, S., Bender, J., Weigel, H.J., Overmyer, K., Kangasjarvi, J., Sandermann, H. & Langebartels, C. (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell and Environment*, 25, 717-726.
- Zar, J.H. (ed.) Biostatistical Analysis, , Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 4th edn, 1999.
- Zhang, J., Ferdinand, J.A., Vanderheyden, D.J., Skelly, J.M. & Innes, J.L. (2001) Variation of gas exchange within native plant species of Switzerland and relationships with ozone injury: an open-top experiment. *Environmental Pollution*, 113, 177-185.